

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE BIOLOGÍA**  
**Departamento de Microbiología III**



**RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL Y CELULAR  
ASOCIADA AL MECANISMO DE ACCIÓN DE LA  
TOXINA PMKT DE *PICHIA MEMBRANIFACIENS*.**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

**Manuel San Mauro Martín**

Bajo la dirección de los doctores

Domingo Marquina Díaz  
Antonio Santos de la Sen

**Madrid, 2009**

- **ISBN: 978-84-692-6498-0**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE BIOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA III



**Respuesta transcripcional y celular asociada al  
mecanismo de acción de la toxina PMKT de  
*Pichia membranifaciens***

**TESIS DOCTORAL**

**Manuel San Mauro Martín**

Madrid, 2009

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE BIOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA III



**Respuesta transcripcional y celular asociada al  
mecanismo de acción de la toxina PMKT de  
*Pichia membranifaciens***

*Memoria presentada por MANUEL SAN MAURO MARTÍN para optar al  
Grado de Doctor en Ciencias Biológicas*

**Manuel San Mauro Martín**

*Vº Bº, los Directores del trabajo*

Dr. Domingo Marquina Díaz

Dr. Antonio Santos de la Sen

*Madrid, 2009*

*A mis padres y hermanos.*

*A Virginia.*



## ABREVIATURAS

---

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ADNdc	ADN de doble cadena
ARN	Ácido ribonucleico
ARNdc	ARN de doble cadena
ARNt	ARN transferente
ATP	Adenosín trifosfato
dATP	Nucleótido 2'-deoxiadenosina 5'-trifosfato
dCTP	Nucleótido 2'-deoxicitidina 5'-trifosfato
DEPC	Dietil pirocarbonato
dGTP	Nucleótido 2'-deoxiguanosina 5'-trifosfato
dNTPs	Dexosinucleótidos trifosfato
dTTP	Nucleótido 2'-deoxitimidina 5'-trifosfato
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GPI	Glucosil fosfatidil inositol
HOG	<i>High Osmolarity Glycerol</i>
HSP	Proteína de choque térmico
MAP	Proteína activada por mitógenos
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico
ORF	Marco de lectura abierta
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PI-PLC	Fosfolipasa C específica de fosfatidil inositol
Pir	Proteínas con repeticiones internas
PMKT	<i>Pichia membranifaciens Killer Toxin</i>
PMSF	Fluoruro de fenilmetil sulfonilo
Polimerasa Taq	ADN polimerasa de <i>Thermus aquaticus</i>
PVDF	Fluoruro de polivinildeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
ScV	Virus de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Dodecil sulfato sódico
SGD	<i>Saccharomyces cerevisiae Genome Database</i>
STREs	Elementos de respuesta a estrés
TAE	Tris-acetato-EDTA
TFA	Trifluoroacético
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
UA	Unidades arbitrarias
UDP	Uridina 5'-difosfato
UV	Ultravioleta

---

## CÓDIGO AMINOACÍDICO

Nombre	Abreviatura	Letra
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Glutamina	Gln	Q
Ácido glutámico	Glu	E
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptófano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

# ÍNDICE

	Página
<b>1 INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Fenómeno <i>killer</i> en levaduras .....	2
1.2 Sistema <i>killer</i> de <i>S. cerevisiae</i> .....	3
1.2.1 Toxina K1 de <i>S. cerevisiae</i> .....	6
1.2.2 Toxina K28 de <i>S. cerevisiae</i> .....	8
1.3 Otras toxinas <i>killer</i> .....	10
1.4 Mecanismos de acción de las toxinas <i>killer</i> .....	10
1.4.1 Mecanismo de acción de la toxina K1 de <i>S. cerevisiae</i> .....	12
1.4.2 Mecanismo de acción de la toxina K28 de <i>S. cerevisiae</i> .....	16
1.5 Toxinas <i>killer</i> del género <i>Pichia</i> .....	19
1.5.1 <i>Pichia membranifaciens</i> y su toxina <i>killer</i> PMKT .....	19
1.6 Rutas de señalización celular mediadas por MAPKs como respuesta adaptativa a cambios en el entorno .....	23
1.6.1 Principales características de la ruta HOG en <i>S. cerevisiae</i> .....	25
1.7 Aplicaciones reales y potenciales de las toxinas <i>killer</i> .....	27
1.7.1 Aplicación en la industria de la fermentación.....	29
1.7.2 Aplicación médica .....	30
1.7.3 Aplicación en estudios taxonómicos .....	31
1.7.4 Aplicación en estudios genéticos .....	31
1.7.5 Aplicación en biodeterioro.....	31
1.7.6 Aplicación de la levadura <i>killer P. membranifaciens</i> CYC 1106 y su toxina PMKT en el área biotecnológica .....	32
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>35</b>
<b>3 MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>37</b>
3.1 Microorganismos .....	38
3.2 Mantenimiento de los microorganismos .....	38
3.3 Medios de cultivo .....	38
3.3.1 Medios de mantenimiento.....	39
3.3.1.1 Medio base YMA ( <i>Yeast Morphology Agar</i> ) .....	39
3.3.1.2 Medio de mantenimiento para mutantes de delección .....	39
3.3.2 Medios de detección de actividad <i>killer</i> .....	39
3.3.2.1 Medio base YMAMB ( <i>YMA-Methylene Blue</i> ).....	39
3.3.2.2 Medio de detección de actividad <i>killer</i> para los mutantes de delección deficientes en el anclaje GPI .....	40
3.3.3 Medios para la producción de toxina <i>killer</i> .....	40
3.3.3.1 YMB tamponado ( <i>Yeast Morphology Broth</i> ).....	40

	Página
3.3.3.2 YNBG ( <i>Yeast Nitrogen Base-Glucose</i> ).....	40
3.3.3.3 YNB-D-Brij-58 (YNB-Dextrosa-Brij-58).....	41
3.3.4 Medio para la regeneración de protoplastos.....	41
3.3.5 Medio <i>Yeast Tryptone Agar</i> (2xYT) para la obtención de células competentes y la transformación.....	41
3.4 Ensayo de actividad <i>killer</i> por el método de difusión en placa .....	42
3.5 Producción y purificación de la toxina <i>killer</i> PMKT .....	42
3.5.1 Isoelectroenfoque preparativo en Ultrodex .....	43
3.5.2 Cromatografía de afinidad.....	43
3.5.3 Electroforesis (PAGE-SDS) .....	44
3.6 Cinética de muerte por acción de la toxina <i>killer</i> PMKT en la cepa sensible <i>S. cerevisiae</i> BY4743.....	44
3.7 Análisis de la respuesta transcripcional por acción de PMKT y aislamiento de ARN .....	45
3.8 Hibridación de los <i>microarrays</i> de ADN y obtención de datos .....	45
3.9 PCR Cuantitativa en Tiempo Real (Q-RT-PCR).....	46
3.10. Electroforesis de ARN en geles de agarosa.....	48
3.11 <i>Northern Blot</i> para el análisis de genes cuya expresión se ve condicionada por la presencia de PMKT .....	48
3.11.1 Prehibridación .....	49
3.11.2 Hibridación .....	49
3.11.3 Generación de sondas de ADN .....	50
3.11.4 Marcaje de las sondas .....	51
3.11.5 Purificación de las sondas marcadas.....	51
3.11.6 Electroforesis de los ARN empleados en <i>Northern Blotting</i> .....	52
3.12 Detección por <i>Western Blot</i> de Hog1p y Hog1p fosforilado .....	52
3.13 Determinación de glicerol .....	53
3.14 Preparación de protoplastos.....	54
3.15 Ensayos de unión de la toxina a protoplastos y a células completas.....	54
3.16 Aislamiento de proteínas de membrana plasmática.....	55
3.17 Aislamiento de proteínas de pared celular .....	55
3.18 Purificación del receptor secundario (Cwp2p) por cromatografía de afinidad .....	56
3.19 Secuenciación del extremo amino terminal del receptor secundario .....	57
3.20 Espectrometría de masas MALDI-TOF-MS para el análisis del receptor secundario .....	57
3.21 Construcción de la proteína de fusión GFP-Cwp2p .....	57
3.21.1 Descripción general del procedimiento .....	58
3.21.2 Obtención de células competentes .....	59
3.21.3 Transformación, selección de transformantes y clonación en <i>E. coli</i> .....	59
3.21.4 Purificación del plásmido por MINIPREP .....	60
3.21.5 Incubación con enzimas de restricción .....	60
3.21.6 Transformación en levaduras sensibles a PMKT.....	60
3.22 Microscopía de fluorescencia .....	61

	Página
3.23 Preparación de liposomas cargados con carboxifluoresceína e incorporación de Cwp2p .....	61
3.23.1 Actividad de la toxina sobre liposomas mediante la determinación de la salida de carboxifluoresceína.....	62
3.24 Tratamientos con fosfolipasa C específica de fosfatidil inositol .....	63
3.25 Mutantes deficientes en el anclaje a las moléculas de GPI .....	63
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>64</b>
4.1 Cinética de muerte de la levadura sensible por acción de la toxina PMKT.....	65
4.2 Análisis de los perfiles de expresión génica en la cepa <i>S. cerevisiae</i> BY4743 tras su exposición a PMKT basados en <i>microarrays</i> de ADN y Q-RT-PCR .....	65
4.3 <i>Northern Blot</i> para el análisis de genes cuya expresión se ve condicionada por la presencia de PMKT .....	73
4.4 Determinación de glicerol .....	75
4.5 Detección por <i>Western Blot</i> de Hog1p y fosforilación de Hog1p.....	75
4.6 Estudios de sensibilidad a la toxina PMKT mediante el empleo de mutantes de delección. Análisis de la respuesta transcripcional global .....	76
4.7 Determinación del receptor de PMKT. Estudios de sensibilidad a la toxina <i>killer</i> mediante el empleo de mutantes de delección .....	76
4.8 Regeneración de los protoplastos tras el tratamiento con la toxina PMKT .....	77
4.9 Ensayos de unión de la toxina a protoplastos y a células completas.....	77
4.10 Purificación del receptor secundario (Cwp2p) por cromatografía de afinidad .....	88
4.11 Secuenciación del amino terminal del receptor secundario .....	90
4.12 Estudios de sensibilidad a PMKT en mutantes deficientes en el anclaje de proteínas a las moléculas de GPI.....	91
4.13 Estudio de la sensibilidad a PMKT en liposomas que presentan la proteína Cwp2p incorporada .....	92
4.14 Localización de Cwp2p en células sensibles y determinación de la viabilidad celular .....	93
<b>5 DISCUSIÓN .....</b>	<b>95</b>
5.1 Correlación con respuestas a estrés ya conocidas en levaduras .....	97
5.1.1 Respuesta celular para el mantenimiento de la homeostasis iónica .....	98
5.1.2 Síntesis y acumulación de osmolitos compatibles .....	107
5.2 Mecanismos generales de respuesta a estrés .....	115
5.3 Determinación del receptor secundario de la toxina <i>killer</i> PMKT .....	120
5.3.1 Proteínas con anclaje tipo GPI como posibles receptores funcionales de la toxina PMKT.....	120
5.3.2 Caracterización de Cwp2p como receptor secundario de la toxina PMKT ...	124
5.3.3 Interacción de Cwp2p y la toxina PMKT .....	126
<b>6 CONCLUSIONES .....</b>	<b>131</b>

	Página
<b>7 BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>134</b>
<b>8 ANEXOS .....</b>	<b>178</b>
Anexo 1. Soluciones y reactivos preparados en el desarrollo experimental .....	179
Anexo 2. Tabla 12 y Tabla 13.....	188

## ***1 INTRODUCCIÓN***

## 1.1 Fenómeno *killer* en levaduras

M. Makower y E. A. Bevan describieron por primera vez la actividad *killer* en 1963 (Makower & Bevan, 1963). Fue entonces cuando se comprobó que ciertas cepas de levaduras pertenecientes a la especie *Saccharomyces cerevisiae* eran capaces de inhibir el crecimiento de otras, pudiéndose establecer analogías con el fenómeno de inhibición bacteriana mediado por bacteriocinas descubierto años antes por Gratia (1925). Como resultado de esas primeras investigaciones, se definió un sistema de tres fenotipos distintos para agrupar las cepas en función del nuevo carácter encontrado: ***killer*** (cepas de levadura capaces de inhibir el crecimiento de ciertas cepas pertenecientes al fenotipo *sensible*), ***sensible*** (cepas inhibidas por la acción de ciertas cepas *killer*) y ***neutro*** (cepas que no pertenecían ni al fenotipo *killer* ni al fenotipo *sensible*). Posteriormente, Woods y Bevan redefinieron este sistema y llevaron a cabo una primera caracterización físico-química de la actividad *killer* en *S. cerevisiae*. Determinaron que la naturaleza del fenómeno se basaba en la secreción de toxinas de carácter proteico, sensibles al calor y habitualmente activas a pH ácidos (Woods & Bevan, 1968). La inmunidad y producción de estas toxinas se correlacionó con la presencia de elementos extracromosómicos, de herencia no mendeliana, que fueron identificados como virus ARN de doble cadena (Somers & Bevan, 1969; Bevan *et al.*, 1973; Vodkin *et al.*, 1974).

Investigaciones posteriores han determinado que la actividad *killer* no es exclusiva de *S. cerevisiae*, sino que está presente en otras especies de levaduras pertenecientes a géneros como *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Sporidiobolus*, *Williopsis* y *Zygosaccharomyces* (Ohta *et al.*, 1984; Hayman & Bolen, 1991; Radler *et al.*, 1993; McCracken *et al.*, 1994; Janderová *et al.*, 1995; Magliani *et al.*, 1997a; Santos *et al.*, 2000), variando su incidencia significativamente dentro de ellos. Así mismo, el aumento del número y exhaustividad de estos estudios a lo largo de los años ha confirmado que el alcance del fenómeno es aún mayor, definiéndose nuevos fenotipos *killer* y sensibles entre diversas especies de hongos filamentosos e, incluso, en procariotas (ej: Polonelli & Morace, 1986; Aliouat *et al.*, 1993; Séguy *et al.* 1994; Provost *et al.*, 1995; Walker *et al.*, 1995; Park *et al.*, 1996; Weiler & Schmitt, 2003; Santos *et al.*, 2004; Santos & Marquina, 2004b). De este modo, la susceptibilidad mostrada por ciertos microorganismos como son por ejemplo *Mycobacterium tuberculosis*, *Pneumocystis jiroveci*, *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* y *Ophiostoma ulmi*, o la producción de toxina *killer* por parte de *Ustilago maydis*, han permitido una reevaluación de la actividad *killer* que se ha traducido en un incremento del número de las posibles aplicaciones clínicas, industriales y ambientales



que en un principio quedaban restringidas a levaduras (Polonelli & Morace, 1986; Magliani *et al.*, 1997a). Puesto que la naturaleza de este fenómeno ha resultado ser muy variable incluso entre distintas cepas de una misma especie, se ha podido determinar que el carácter *killer* tiene una gran diversidad desde el punto de vista estructural, funcional y ecológico (Tipper & Bostian, 1984).

Además de las cepas de levaduras incluidas en colecciones, las cepas *killer* están distribuidas en un amplio rango de ambientes naturales (Naumov & Naumova, 1973; Philliskirk & Young, 1975; Stumm *et al.*, 1977; Shimizu *et al.*, 1985; Marquina *et al.*, 1992, 1997). De hecho, la frecuencia de aislamiento de estas cepas en ambientes naturales es notablemente mayor (17% aprox.) que en aislamientos de colecciones de laboratorio (7%) (Young, 1987). Aunque el motivo que justifica esta prevalencia no está del todo claro y si además se tiene en cuenta que las condiciones escogidas para la determinación de la actividad *killer* (temperatura, pH, salinidad...) resultan decisivas para no subestimar esta frecuencia de aislamiento (Tipper & Bostian, 1984; Marquina *et al.*, 1992; Llorente, 1997), es posible que este hecho pueda deberse a la ventaja competitiva que el carácter *killer* ofrece frente a las cepas sensibles en estos ambientes (Gill, 1974; Philliskirk & Young, 1975). Según Starmer *et al.* (1987), la actividad *killer* podría jugar incluso un papel importante en la determinación de la distribución de las distintas especies de levaduras en plantas. Esta ventaja competitiva podría también explicar el gran número de aislamientos contaminantes que, en ciertos procesos industriales de fermentación (vino, cerveza, sake, aceitunas, etc.), resultan ser poseedores del carácter *killer* (Philliskirk & Young, 1975).

## 1.2 Sistema *killer* de *S. cerevisiae*

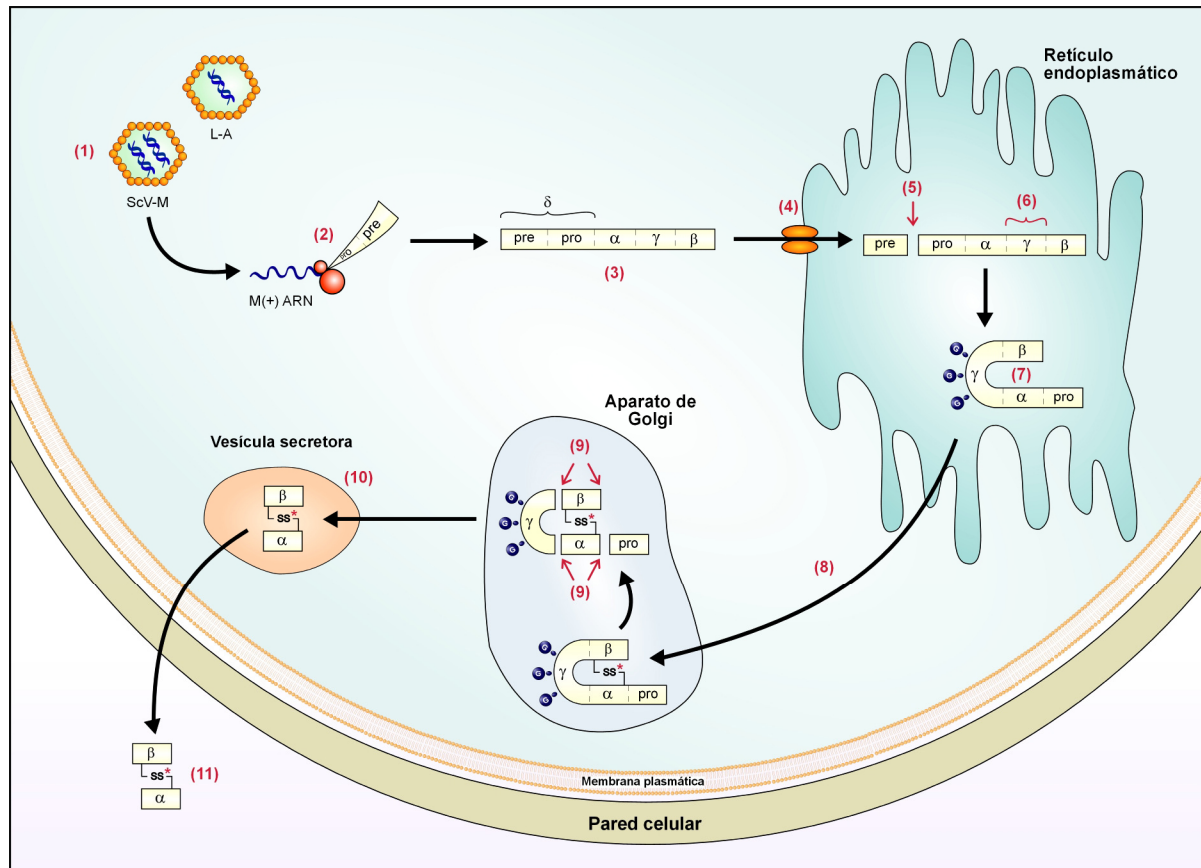
Tradicionalmente se utiliza el modelo de *S. cerevisiae* como referencia en los procesos de síntesis y secreción de toxinas *killer*. Esto es debido, primero, a que fue la levadura donde el fenómeno *killer* fue descrito inicialmente; segundo, a la simplicidad de su aplicación para la realización de análisis genéticos y bioquímicos; y tercero, a las grandes posibilidades que desde 1996 ofrece la secuenciación completa de su genoma. En *S. cerevisiae* el fenotipo *killer* viene determinado por la presencia en el citoplasma de micovirus de ARNdc lineal pertenecientes a la familia *Totiviridae* (Bruenn, 1980). Hay descritos tres genomas víricos principales (ScV-M1, ScV-M2 y ScV-M28), que codifican los precursores (pre-protoxinas) de las tres toxinas hasta ahora descritas en dicha levadura (K1, K2 y K28, respectivamente) además de sus correspondientes factores de autoinmunidad (Wickner, 1992). Los procesos de replicación y encapsidación de estos virus dependen de la acción de otras partículas víricas, también de ARNdc lineal, denominadas “virus *helper*” o “virus L-A”

(Sommer & Wickner, 1982; Schmitt, 1995; Walker *et al.*, 1995). A diferencia de los ScV-M, que presentan un único marco de lectura abierta (ORF; *Open Reading Frame*) en su genoma, los virus L-A presentan dos ORFs en sentido positivo: el ORF1, que codifica para la proteína principal de la cápside, Gag, que es imprescindible para la correcta encapsidación y determina la estructura de las partículas virales (ScV-M y L-A), y el ORF2, que codifica para una ARN polimerasa (Pol) dependiente de ARN que se expresa como una proteína de fusión Gag-Pol (Wickner, 1992) (Tabla 1). La coinfección de los virus L-A con los ScV-M es necesaria para que el fenotipo *killer* se manifieste (Bussey *et al.*, 1982; Zhu *et al.*, 1993). Ambos virus se encuentran encapsidados por separado en el citoplasma de la levadura en forma de VLPs (*Virus-Like Particles*) (Bostian *et al.*, 1980; Bussey *et al.*, 1982; Tipper & Bostian, 1984; Park *et al.*, 1996), partículas intracelulares ampliamente distribuidas en la naturaleza (bacterias, Van Etten *et al.*, 1976; hongos filamentosos, Buck, 1980; plantas, Grill & Grarger, 1981; y animales, Joklik, 1974, Scott *et al.*, 1980). Las VLPs de levaduras *killer* no muestran *in vivo* capacidad infectiva o ciclo lítico, son “micovirus latentes” incapaces de transmitirse extracelularmente (Tipper & Bostian, 1984), y son heredadas exclusivamente por vía citoplasmática (Bussey *et al.*, 1982).

**Tabla 1.** Características principales de los virus que confieren el carácter *killer* en *S. cerevisiae*.

Virus	Función	ARNdc (kb)	Proteínas codificadas	Referencia
ScV-L-A	Virus <i>helper</i>	4,6	Gag, proteína principal de la cápside; Pol, ARN polimerasa dependiente de ARN	Icho & Wickner, 1989
ScV-M1	Virus <i>killer</i>	1,6	Pre-protoxina K1, precursor no procesado de la toxina K1 y determinante de auto-inmunidad	Hanes <i>et al.</i> , 1986
ScV-M2	Virus <i>killer</i>	1,5	Pre-protoxina K2, precursor no procesado de la toxina K2 y determinante de auto-inmunidad	Dignard <i>et al.</i> , 1991
ScV-M28	Virus <i>killer</i>	1,8	Pre-protoxina K28, precursor no procesado de la toxina K28 y determinante de auto-inmunidad	Schmitt & Tipper, 1995

El proceso de síntesis de las toxinas *killer* de *S. cerevisiae* comienza cuando el ORF en sentido positivo del virus ScV-M, transcrito previamente por acción de la ARN polimerasa (Gag-Pol), es liberado de la partícula viral y posteriormente traducido en el citoplasma para dar lugar a la pre-protoxina. A continuación, este polipéptido precursor es procesado enzimáticamente a través de la ruta secretora de la levadura (retículo endoplasmático, aparato de Golgi y vesículas secretoras) y transportado al medio exterior en forma de toxina activa (Figura 1), de manera homóloga a como sucede con las pro-hormonas en las células de mamífero (Schmitt & Tipper, 1995). Dependiendo del tipo de toxina *killer* (K1, K2 o K28) la secuencia aminoacídica que constituye la pre-protoxina es diferente pero, tanto a nivel



**Figura 1. Etapas generales del proceso de maduración (síntesis, procesamiento y secreción) de los distintos tipos de toxina killer (K1, K2 y K28) de *S. cerevisiae*.** (1) Salida de la hebra en sentido positivo del virus ScV-M (M(+)-ARN) al citoplasma celular. (2) Traducción *in vivo* del ORF mediante el empleo de la maquinaria ribosomal de la levadura. (3) Principales dominios de la pre-protoxina. En el caso de la toxina K2 este precursor carece del dominio  $\gamma$ . (4) Internalización de la pre-protoxina en el retículo endoplasmático por reconocimiento de la secuencia señal. (5) Escisión del fragmento N-terminal "pre" por acción del complejo peptidasa señal. (6) N-glicosidación de las secuencias específicas presentes en la protoxina debido a la actividad de una enzima glicosilasa. En el caso de K1 y K28, la glicosidación ocurre en el dominio  $\gamma$ . La N-glicosidación de la protoxina K2 tiene lugar en dos posiciones específicas del dominio  $\alpha$  (Magliani *et al.*, 1997a). (7) Formación de puentes disulfuro (-ss-) entre los dominios  $\alpha$  y  $\beta$  por acción de una isomerasa. El número de puentes disulfuro varía dependiendo del tipo de toxina (\*). (8) Internalización de la protoxina en las vesículas del aparato de Golgi. (9) Procesamiento del segmento "pro" y de los dominios  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  por acción de las peptidasas Kex1p y Kex2p, que escinden la toxina en cada uno de sus componentes hasta constituir su forma activa. (10) Transporte en vesículas secretoras y (11) liberación de la toxina madura (activa) al medio extracelular.

estructural como a nivel de procesamiento, en la maduración de todas ellas se pueden establecer ciertas semejanzas. Primero, la presencia de un segmento hidrofóbico situado en el extremo N-terminal que incluye la secuencia específica de entrada al retículo endoplasmático y que es procesado por el complejo peptidasa señal (formado por las proteínas: Spc1p, Spc2p, Spc3p y Sec11p). Este segmento, de mayor longitud que los que se encuentran habitualmente en las proteínas que se secretan, conforma el dominio  $\delta$  de las toxinas K1 y K28. Segundo, la existencia de los dominios  $\alpha$  y  $\beta$ , situados a continuación de la secuencia anterior y que constituyen, respectivamente, las dos subunidades del heterodímero que conforman la toxina madura (activa). Tercero, N-glicosidación de secuencias específicas presentes en la protoxina debido a la actividad de una enzima

glicosilasa, necesaria para que la secreción resulte eficiente (Bussey *et al.*, 1983). En el caso de las toxinas K1 y K28 estas secuencias para la glicosidación se incluyen dentro del dominio  $\gamma$ , situado entre  $\alpha$  y  $\beta$  y relacionado con el fenómeno de autoinmunidad ante la propia toxina secretada; en la toxina K2 el fenómeno de glicosidación tiene lugar dentro del dominio  $\alpha$ . Cuarto, la presencia de regiones específicas para el procesamiento por peptidasas Kex en las vesículas del aparato de Golgi. Y quinto, transporte en vesículas secretoras y liberación de la toxina madura, heterodímero  $\alpha$ - $\beta$  unido por puentes disulfuro ( $n^\circ$  variable dependiendo del tipo de toxina), al exterior (Figura 1) (Dignard *et al.*, 1981; Tipper & Bostian, 1984; Magliani *et al.*, 1997a).

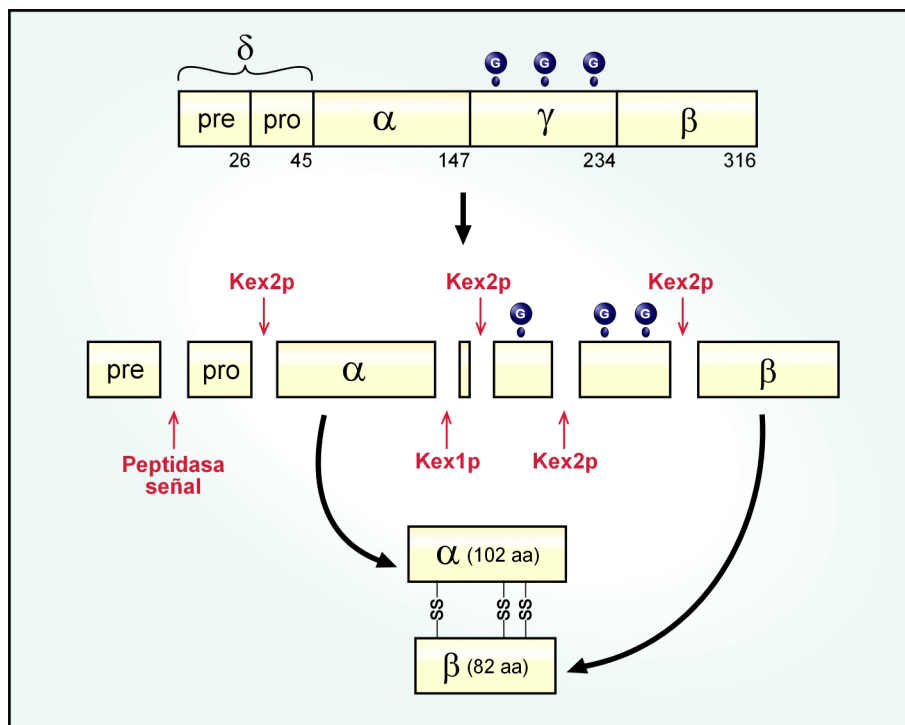
En el medio extracelular, la cantidad total de toxina secretada sufre una reducción significativa debida fundamentalmente a dos procesos diferentes: la proteólisis directa de la toxina por la acción de ciertas proteasas producidas por la levadura *killer* (Wickner, 1993), y la unión de la toxina a receptores específicos localizados en la pared celular de la cepa productora (Hutchins & Bussey, 1983; Sturley *et al.*, 1986; Schmitt & Radler, 1988; Breinig *et al.*, 2006). La toxina restante interaccionará con la levadura sensible y mediará su muerte celular por un mecanismo de acción que resulta distinto dependiendo del tipo de toxina del que se trate (Bussey & Sherman, 1973; Skipper & Bussey, 1977; Schmitt *et al.*, 1996). Esta interacción ha puesto de manifiesto la existencia de distintos tipos de receptores en la cepa sensible necesarios para que la actividad *killer* pueda desarrollarse en *S. cerevisiae*.

De los tres tipos de toxinas principales que constituyen el sistema *killer* de *S. cerevisiae*, la K1 y la K28 son las que más extensamente se han estudiado y las que actualmente se utilizan como modelo de referencia en los procesos de síntesis, maduración, secreción e inmunidad. Por este motivo, en este apartado nos hemos centrado fundamentalmente en ellas.

### 1.2.1. Toxina K1 de *S. cerevisiae*

El proceso de traducción del M1(+)-ARN que tiene lugar en el citoplasma de la levadura va a originar un precursor proteico (pre-prototoxina) de 316 aminoácidos de longitud y 35 kDa de masa molecular (Bostian *et al.*, 1984; Lolle *et al.*, 1984). Los residuos 1-44 en el extremo N-terminal constituyen el dominio  $\delta$ , en el que se incluye el péptido señal o fragmento “pre” (26 aminoácidos), que contiene una secuencia hidrofóbica específica de reconocimiento para la entrada en el retículo endoplasmático (Skipper *et al.*, 1984; Lolle & Bussey, 1986), y el fragmento “pro” (18 aminoácidos), que interviene en etapas posteriores de maduración y secreción de la prototoxina (Hanes *et al.*, 1986). A continuación se encuentran los dominios  $\alpha$  y  $\beta$ , comprendidos entre las posiciones 45-147 y 234-316

respectivamente, y entre ellos el dominio  $\gamma$ , con un tamaño total de 86 residuos y con los tres únicos sitios susceptibles de N-glicosidación en la pre-protoxina (Asn-X-Thr/Ser, en posiciones 181, 203 y 216) (Bostian *et al.*, 1984; Skipper *et al.*, 1984; Sturley *et al.*, 1986; Zhu *et al.*, 1987) (Figura 2).



**Figura 2. Representación esquemática de la pre-protoxina K1 de *S. cerevisiae*.** En la figura se muestran los diferentes motivos ( $\delta$ ,  $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\beta$ ) que constituyen el precursor proteico y los números de los residuos que indican sus posiciones respectivas dentro de la secuencia aminoacídica. Los tres sitios susceptibles de N-glicosidación aparecen representados con la letra G. A lo largo de la ruta secretora de la levadura, el proceso de maduración de la pre-protoxina implica la actuación de diversas enzimas (complejo peptidasa señal, Kex1p, Kex2p) que median la escisión proteolítica de esta en ciertas posiciones específicas de su secuencia (flechas en rojo). La toxina madura, constituida por el heterodímero  $\alpha$ - $\beta$  unido por tres puentes disulfuro (-SS-), es secretada al medio extracelular.

En su entrada al retículo endoplasmático, el fragmento “pre” es escindido por acción del complejo peptidasa señal entre los residuos Ala<sup>26</sup> y Leu<sup>27</sup> (Hanes *et al.*, 1986; Perlman & Halvorson, 1993; Zhu *et al.*, 1993). El polipéptido resultante, la protoxina, es N-glicosilado debido a la actividad de la enzima endoglicosilasa H (Bostian *et al.*, 1983) y posteriormente procesado para favorecer su translocación a las vesículas del Golgi donde continúa la maduración (Magliani *et al.*, 1997a). Este procesamiento, en el que el dominio  $\gamma$  podría actuar como una “chaperona intramolecular”, debe implicar un cambio conformacional de la protoxina para permitir la unión de los dominios  $\alpha$  y  $\beta$  mediante tres puentes disulfuro por acción de una enzima isomerasa (Bostian *et al.*, 1984; Zhu *et al.*, 1987). En las vesículas del Golgi, la endopeptidasa Kex2p es responsable de la escisión proteolítica de la protoxina en cuatro posiciones específicas de su secuencia (ProArg<sup>44</sup>, ArgArg<sup>149</sup>, LysArg<sup>188</sup> y LysArg<sup>233</sup>),

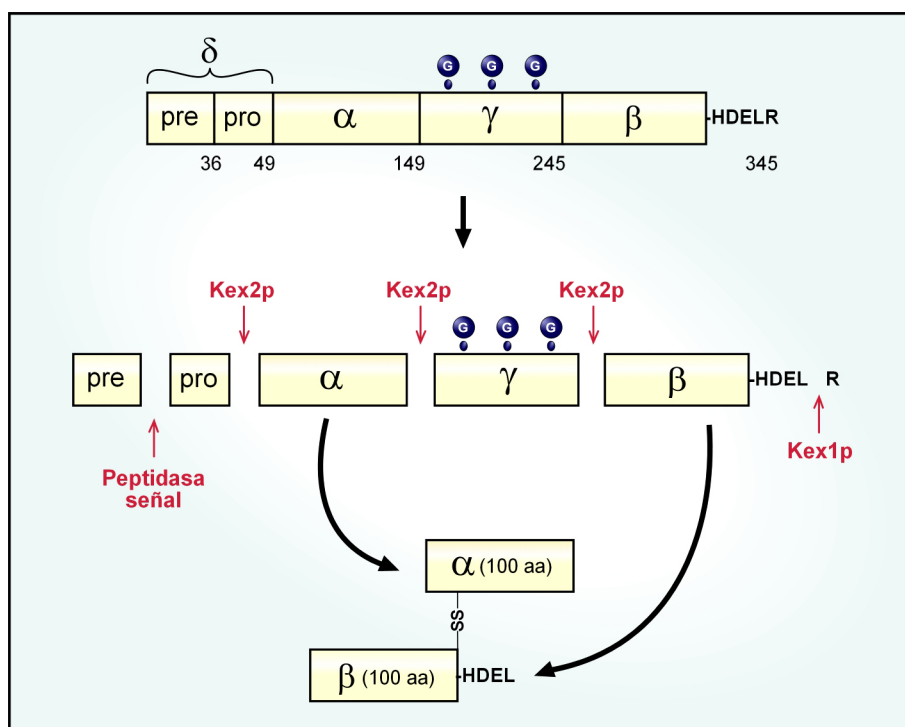
lo que supone la separación de ésta en sus componentes (fragmento “pro”, subunidad  $\alpha$ , subunidad  $\beta$  y dominio  $\gamma$ ) (Julius *et al.*, 1984; Mizuno *et al.*, 1987; Zhu *et al.*, 1992). La subunidad  $\alpha$  es procesada además por la enzima serina-carboxipeptidasa Kex1p, que elimina residuos dibásicos en su extremo C-terminal (Dmochowska *et al.*, 1987). Finalmente, el heterodímero  $\alpha$ - $\beta$ , que constituye la toxina madura (activa), es liberado al medio extracelular a través de la ruta secretora de la levadura (Figuras 1 y 2).

Las cepas K1 de *S. cerevisiae* se muestran inmunes a la acción de su propia toxina por un mecanismo que aún no se comprende con exactitud. Estudios realizados con mutantes *kex2* $\Delta$ , carentes de un correcto procesamiento de la protoxina e incapaces de liberar el heterodímero  $\alpha$ - $\beta$  al medio extracelular, revelaron que la presencia del dominio  $\alpha$  junto con el extremo N-terminal del dominio  $\gamma$  (31 aminoácidos) parecía ser necesario para que la cepa productora resultase inmune (Sturley *et al.*, 1986; Zhu & Bussey, 1991). La primera hipótesis que se propuso para explicar este hecho sostenía que este precursor (protoxina parcialmente procesada) sería capaz de interaccionar con el receptor específico (Kre1p) en la membrana plasmática durante el proceso de secreción, compitiendo de forma efectiva con la toxina madura e impidiendo la acción de ésta sobre la propia célula productora (Bussey *et al.*, 1983; Bostian *et al.*, 1984). Más tarde, se sugirió que la unión del precursor a Kre1p podría ocurrir durante la secreción pero en la vacuola, lo que supondría la deslocalización del receptor en la membrana plasmática o la pérdida de su funcionalidad con motivo de la interacción (Sturley *et al.*, 1986; Tipper & Schmitt, 1991). Estudios basados en la susceptibilidad mostrada por mutantes de delección para ciertos genes (*vps* y *vac*, requeridos en la ruta de degradación proteica entre el Golgi y la vacuola) tras su exposición a la toxina K1 parecen apoyar las premisas de esta hipótesis (Douglas *et al.*, 1988; Valis *et al.*, 2006).

### 1.2.2. Toxina K28 de *S. cerevisiae*

La pre-protoxina K28 de *S. cerevisiae* presenta una masa molecular aproximada de 38 kDa y cuenta con 345 aminoácidos en su secuencia (Pfeiffer & Radler, 1982) (Figura 3). La escisión del fragmento “pre” por parte del complejo peptidasa señal tiene lugar entre los residuos Gly<sup>36</sup> y Met<sup>37</sup> (Riffer *et al.*, 2002), quedando libre la protoxina en el interior del retículo endoplasmático. Del mismo modo que ocurría en las cepas K1, la siguiente etapa en la maduración de la protoxina implica la actividad de una enzima endoglicosilasa, que media la N-glicosidación de tres residuos específicos a lo largo del dominio  $\gamma$  (Schmitt & Tipper, 1995), y de una enzima isomerasa, que en este caso cataliza la formación de un único puente disulfuro entre los residuos Cys<sup>56</sup> ( $\alpha$ ) y Cys<sup>340</sup> ( $\beta$ ) (Riffer *et al.*, 2002). En las vesículas

del Golgi, la actividad de la peptidasa Kex2p es responsable, *in vivo*, del procesamiento de los extremos N- y C-terminal de la subunidad  $\alpha$  (escisiones proteolíticas tras los residuos Arg<sup>49</sup> y Arg<sup>149</sup>, respectivamente) y del extremo N-terminal de la subunidad  $\beta$  (Arg<sup>245</sup>) (Zhu *et al.*, 1992; Riffer *et al.*, 2002). El extremo C-terminal de la subunidad  $\beta$  es escindiendo además por la carboxipeptidasa Kex1p, constituyéndose así la toxina madura (heterodímero  $\alpha$ - $\beta$ ) que es liberada al medio extracelular mediante el transporte en vesículas secretoras. Este procesamiento de  $\beta$  por Kex1p, lisis en Arg<sup>345</sup>, deja al descubierto un motivo de cuatro aminoácidos denominado HDEL (His-Asp-Glu-Leu<sup>344</sup>) cuya presencia resulta ser estrictamente necesaria para la unión e internalización de la toxina en la célula sensible (Schmitt & Eisfeld, 1999; Eisfeld *et al.*, 2000). En esta unión, la presencia del puente disulfuro en posición Cys<sup>340</sup> ( $\beta$ ) parece asegurar la correcta disposición de la secuencia HDEL en su acoplamiento con el receptor (Pelham *et al.*, 1992; Riffer *et al.*, 2002).



**Figura 3. Representación esquemática de la pre-protoxina K28 de *S. cerevisiae*.** En la figura se muestran los diferentes motivos ( $\delta$ ,  $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\beta$ ) que constituyen el precursor proteico y los números de los residuos que indican sus posiciones respectivas dentro de la secuencia aminoacídica. Los cinco últimos aminoácidos del extremo C-terminal de la subunidad  $\beta$  constituyen el motivo -HDEL. Los tres sitios susceptibles de N-glicosilación aparecen representados con la letra G. A lo largo de la ruta secretora de la levadura, el proceso de maduración de la pre-protoxina implica la actuación de diversas enzimas (complejo peptidasa señal, Kex1p, Kex2p) que median la escisión proteolítica de esta en ciertas posiciones específicas de su secuencia (flechas en rojo). La toxina madura, constituida por el heterodímero  $\alpha$ - $\beta$  unido por un único puente disulfuro (-SS-), es secretada al medio extracelular.

El fenómeno de autoinmunidad mostrado por las cepas K28 frente a la acción de su propia toxina fue caracterizado a nivel molecular en el año 2006 (Breinig *et al.*, 2006). Tras

ser liberado al medio extracelular, el heterodímero  $\alpha\beta$  es internalizado (endocitosis) en la célula *killer* por reconocimiento específico de la secuencia HDEL y transportado al citosol a través de la ruta secretora de la levadura en sentido inverso. Una vez allí, la toxina internalizada interacciona con la pre-prototoxina recién traducida en el ribosoma de la célula y el complejo resultante es marcado por la ubiquitina (poli-ubiquitinación de la subunidad  $\beta$  de la toxina madura) para su posterior degradación en el proteosoma. Como consecuencia de esta degradación proteica, la pre-prototoxina que formaba parte del complejo vuelve a ser liberada intacta al citoplasma, pudiendo formar de nuevo parte del proceso descrito anteriormente o ser procesada a través de la ruta secretora para ser liberada al medio extracelular en forma de toxina madura (Breinig *et al.*, 2006).

### 1.3 Otras toxinas *killer*

Como ya se ha mencionado en el apartado 1.1, el fenómeno *killer* está presente en un amplio número de levaduras. En un principio, los estudios realizados entre las cepas *killer* hasta entonces conocidas mostraron que las características físico-químicas de sus toxinas presentaban características similares a las producidas por *S. cerevisiae* (K1, K2 y K28): actividad a pH ácidos y temperaturas inferiores a 25 °C, masa molecular normalmente pequeña, y puntos isoelectrónicos ácidos. Posteriormente, a medida que se fueron describiendo nuevas levaduras *killer*, se puso de manifiesto el elevado número de toxinas que se alejaban de esas características generales en uno u otro aspecto. Es el caso, por ejemplo, de la toxina de *Kluyveromyces lactis*, con 180 kDa de masa molecular (Gunge *et al.*, 1981; Sugisaki *et al.*, 1984); o las toxinas del género *Hansenula*, con alta estabilidad frente a pH y temperatura (Ohta *et al.*, 1984). En lo referente a otras características como la base genética, conformación proteica, glicosidación de la forma activa, tipo de receptor primario, mecanismo de acción e, incluso, posible aplicación (basada principalmente en su especificidad de acción), las toxinas *killer* producidas por las distintas especies muestran aún mayor heterogeneidad (Tabla 2). Esta heterogeneidad, junto a los distintos métodos empleados para determinar los aspectos anteriormente citados, hace difícil la comparación entre toxinas.

### 1.4 Mecanismos de acción de las toxinas *killer*

Una vez sintetizadas y secretadas al medio extracelular, las toxinas *killer* interaccionan con las células sensibles y provocan su muerte induciendo ciertas alteraciones específicas como parte de sus mecanismos de acción. Aunque la diversidad de estas alteraciones se corresponde con la heterogeneidad mostrada por las toxinas producidas por



**Tabla 2** Características de los principales sistemas *killer* de levaduras.

Cepa <i>killer</i>	Subunidades (No.)	Masa molecular (kDa)	Glicoproteína	Base genética	Receptor primario	Modo de acción	Aplicación
<i>Candida glabrata</i>	?	?	Si	Cromosoma	?	Daño en MP	?
<i>Cryptococcus humicola</i>	1	<1	?	Cromosoma	?	?	?
<i>Debaryomyces hansenii</i>	1	23	?	Cromosoma	(1→6)-β-D-glucanos	?	?
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	1	18	No	ARNdc	(1→6)-β-D-glucanos	?	?
<i>Kluyveromyces fragilis</i> <b>Zimocina</b>	3 (α, β, γ)	97; 31; 28	Si (α), No (β, γ)	ADNdc (pGKL1)	Quitina <β2>	Actividad ARNt-asa	Evitar el deterioro aerobio en ensilados
<i>S. cerevisiae</i> <b>K1</b>	2 (α, β)	9,5; 9	No	M <sub>1</sub> -ARNdc	(1→6)-β-D-glucanos	Formación de canales iónicos en MP	Eliminar contaminantes en vino, cerveza, sake, etc. Estudios genéticos
<i>S. cerevisiae</i> <b>K2</b>	2 (α, β)	21; 5	Si	M <sub>2</sub> -ARNdc	(1→6)-β-D-glucanos	Incremento de la permeabilidad de MP	Fermentación de vino
<i>S. cerevisiae</i> <b>K28</b>	2 (α, β)	10,5; 11	Si	M <sub>28</sub> -ARNdc	Manoproteínas	Entrada en la célula por endocitosis e inhibición del ciclo celular en fase S	?
<i>Schwanniomyces occidentalis</i>	2 (α, β)	7,4; 4,9	No	Cromosoma	Manoproteínas	Daño en MP	Evitar contaminantes en fermentaciones industriales
<i>Ustilago maydis</i> <b>KP1</b>	1	13,4	?	ARNdc (P1)	?	?	?
<i>U. maydis</i> <b>KP4</b>	1	11,1	?	ARNdc (P4)	?	Inhibidor de canales Ca <sup>+</sup>	?
<i>U. maydis</i> <b>KP6</b>	2 (α, β)	8,6; 9,1	?	ARNdc (P6)	?	?	?
<i>Williopsis saturnus</i> var. <i>mrakii</i> <b>HM-1 (HMK)</b>	1	10,7	No	Cromosoma	(1→6)-β-D-glucanos; (1→3)-β-D-glucanos	Inhibición de la (1→3)-β-D-glucano sintasa	Ensilado. Yogurt. Control de especies patógenas de <i>Candida</i> y <i>Cryptococcus</i>
<i>W. saturnus</i> var. <i>mrakii</i> <b>WmKT</b>	?	85	Si	?	β-D-glucanos	Actividad β-glucosidasa	Anticuerpos antiidiotípicos contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<i>W. saturnus</i> var. <i>saturnus</i> <b>HY1</b>	1	9,5	No	Cromosoma	?	Inhibición de la (1→3)-β-D-glucano sintasa	?
<i>Zygosaccharomyces bailii</i> <b>KT412</b>	1	10	No	ARNdc	Manoproteínas	Daño en MP	Control levaduras y hongos patógenos

MP, membrana plasmática; ?, datos no conocidos o no disponibles en la bibliografía.

las distintas especies *killer*, en términos generales se puede hablar de tres tipos principales de mecanismos de acción: los que se basan en la actividad enzimática de las toxinas para alterar componentes específicos de la pared celular (Takasuka *et al.*, 1995; Guyard *et al.*, 2002; Comitini *et al.*, 2004; Izgü *et al.*, 2005), los que originan daños a nivel de la membrana plasmática debido a las propiedades ionofóricas de las toxinas (ej: Bussey & Sherman, 1973; Skipper & Bussey, 1977; Middelbeek *et al.*, 1980; Chen *et al.*, 2000; Weiler & Schmitt, 2003; Santos & Marquina, 2004a) y los que interfieren con el ciclo celular mediante la internalización de las toxinas en la célula sensible y su posterior acceso al núcleo (Butler *et al.*, 1991; McCracken *et al.*, 1994; Schmitt *et al.*, 1996; Klassen *et al.*, 2008; Studte *et al.*, 2008). La mayoría de las toxinas *killer* caracterizadas hasta la fecha presentan un mecanismo de acción basado en la actividad ionofórica de éstas o en su capacidad para detener o interferir con el ciclo celular en la cepa sensible, siendo nuevamente las toxinas K1 (ionofórica) y K28 (ciclo celular) producidas por *S. cerevisiae* los modelos más extensamente estudiados. Por este motivo, en este apartado nos hemos centrado fundamentalmente en ellas.

#### 1.4.1 Mecanismo de acción de la toxina K1 de *S. cerevisiae*

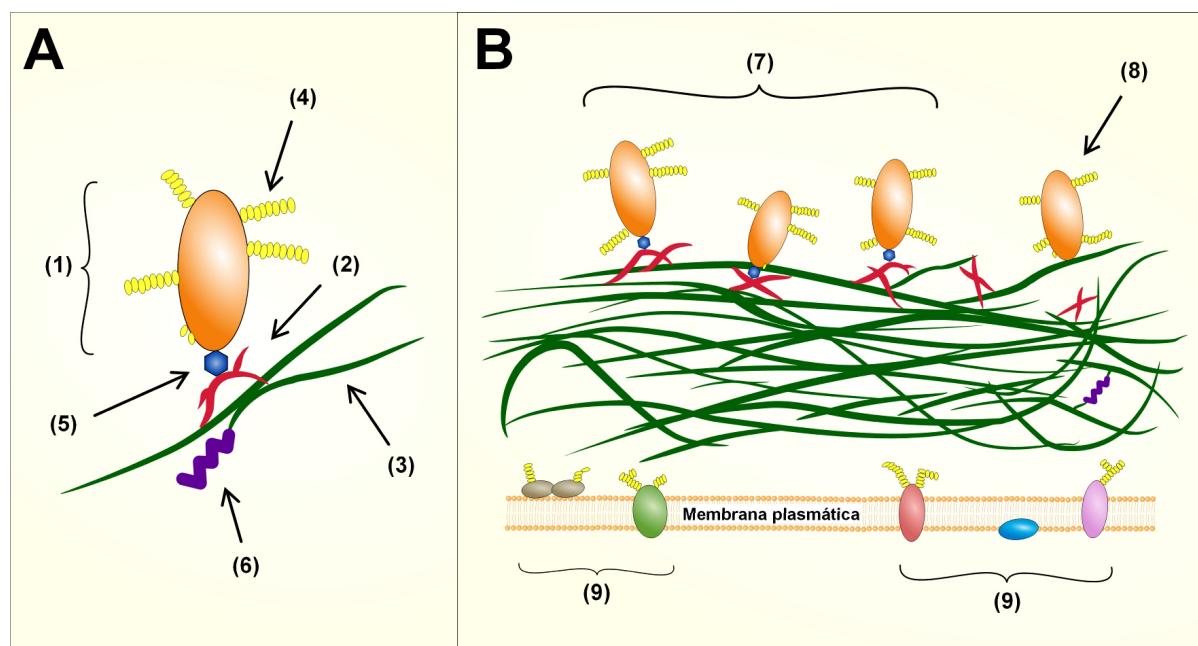
La toxina K1 desarrolla su actividad *killer* por un proceso mediado por la unión a receptores específicos en el que se pueden distinguir dos etapas bien diferenciadas. La primera de ellas implica la interacción de la toxina con su receptor primario localizado en la pared celular de la cepa sensible, los (1→6)- $\beta$ -glucanos (Al-Aidroos & Bussey, 1978; Hutchins & Bussey, 1983). Esta unión, que no precisa de ningún tipo de requerimiento energético (ATP) y que está fuertemente condicionada por el pH del medio externo (Hutchins & Bussey, 1983), tiene una duración aproximada de 3-5 minutos a 20 °C y pH 4,7 (Bussey *et al.*, 1979). En esta etapa, la toxina se concentra en la superficie de la célula sensible, de forma que así se podría favorecer su transición a la siguiente fase en la que la toxina interacciona con su receptor secundario (Figura 5) (Boone *et al.*, 1990).

La pared celular de la levadura es una estructura de aproximadamente 100-200 nm de espesor que está dispuesta alrededor de la membrana plasmática y que constituye el 15-25% del peso seco de la célula. Entre sus funciones principales, cabe destacar: la protección mecánica (rigidez y elasticidad) del protoplasma ante las posibles perturbaciones de origen físico (función esqueleto); la estabilidad osmótica intracelular debido a la regulación parcial del transporte de iones y otras moléculas que determinan los flujos de entrada y salida de agua en la célula; el control del tamaño y la forma celular gracias a la reorganización de las macromoléculas que constituyen la pared durante los procesos

morfogenéticos; y el anclaje de proteínas específicas con importantes actividades enzimáticas asociadas (sobre todo hidrólisis de nutrientes), adhesinas (floculación y conjugación) y diversas proteínas con función receptor que intervienen en el reconocimiento de feromonas, toxinas y otras sustancias para mediar la interacción con el medio extracelular (ej: Hutchins & Bussey, 1983; Schmitt & Radler, 1987, 1988; Stratford, 1994; Jiang *et al.*, 1995; Kollár *et al.*, 1997; Lipke & Ovalle, 1998; Kapteyn *et al.*, 1999a; Santos *et al.*, 2000, 2002; Zhang *et al.*, 2002; Klis *et al.*, 2006; Dranginis *et al.*, 2007; Shi *et al.*, 2007).

La pared celular de *S. cerevisiae* está formada por cinco clases principales de macromoléculas que son, (1→6)-β-glucanos, (1→3)-β-glucanos, mananos (polisacáridos de manosa con enlace tipo α-(1→6)), quitina y proteínas de la pared o CWP (Cell Wall Proteins). Todos estos componentes están distribuidos en dos capas, una interna formada por los polisacáridos y dispuesta como una red microfibrilar tridimensional parcialmente ordenada, y otra externa donde se insertan las proteínas manosiladas en contacto directo con el exterior celular (Lipke & Ovalle, 1998; Kapteyn *et al.*, 1999a; Klis *et al.*, 2002, 2006) (Figura 4). Los (1→3)-β-glucanos, polímeros lineales con bajo grado de ramificación compuestos por unos 1500 residuos de glucosa (Manners *et al.*, 1973a), constituyen la estructura principal de la capa interna y, junto con la quitina, son responsables de la rigidez, forma y elasticidad celular (Fleet *et al.*, 1991). En la cara exterior de esta red de (1→3)-β-glucanos se encuentran unidas cadenas muy ramificadas de (1→6)-β-glucanos, moléculas formadas por aproximadamente 140 residuos de glucosa que sirven de anclaje para ciertas CWPs (Manners *et al.*, 1973b). En la cara interior de esta misma red se encuentra unida la mayor parte de la quitina, un polímero compuesto por residuos de N-acetilglucosamina que refuerza la estructura de la pared en situaciones de estrés y que se deposita en forma de anillo alrededor de las yemas nacientes tras la citoquinesis durante la división celular (Manners *et al.*, 1973b; Roberts *et al.*, 1983; Kapteyn *et al.*, 1999a). La capa externa de la pared celular está formada por las CWPs, todas ellas unidas a la fracción manano mediante enlace covalente. Estas manoproteínas de elevado grado de glicosidación se pueden incluir dentro de dos categorías principales: proteínas GPI (Glucosil fosfatidil inositol), ricas en serina y treonina (Caro *et al.*, 1997) y portadoras de residuos remanentes del procesamiento de GPI en su extremo C-terminal por el cual se unen a la matriz de (1→3)-β-glucanos a través de módulos de (1→6)-β-glucanos (de Nobel & Lipke, 1994; Montijn *et al.*, 1994; De Groot, 2005); y proteínas Pir, con una o más repeticiones internas (Toh-e *et al.*, 1993; Mrsa *et al.*, 1997), sin sistema de anclaje GPI y unidas directamente a la matriz de (1→3)-β-glucanos mediante un mecanismo que aún se desconoce (Kapteyn *et al.*, 1999a; Ecker *et al.*, 2006). Se ha propuesto que las CWPs, los (1→6)-β-glucanos y los (1→3)-β-glucanos podrían

funcionar, en proporción 1:1:1, como unidades estructurales elementales en la pared celular (Klis *et al.*, 1997; Lipke & Ovalle, 1998) (Figura 4).



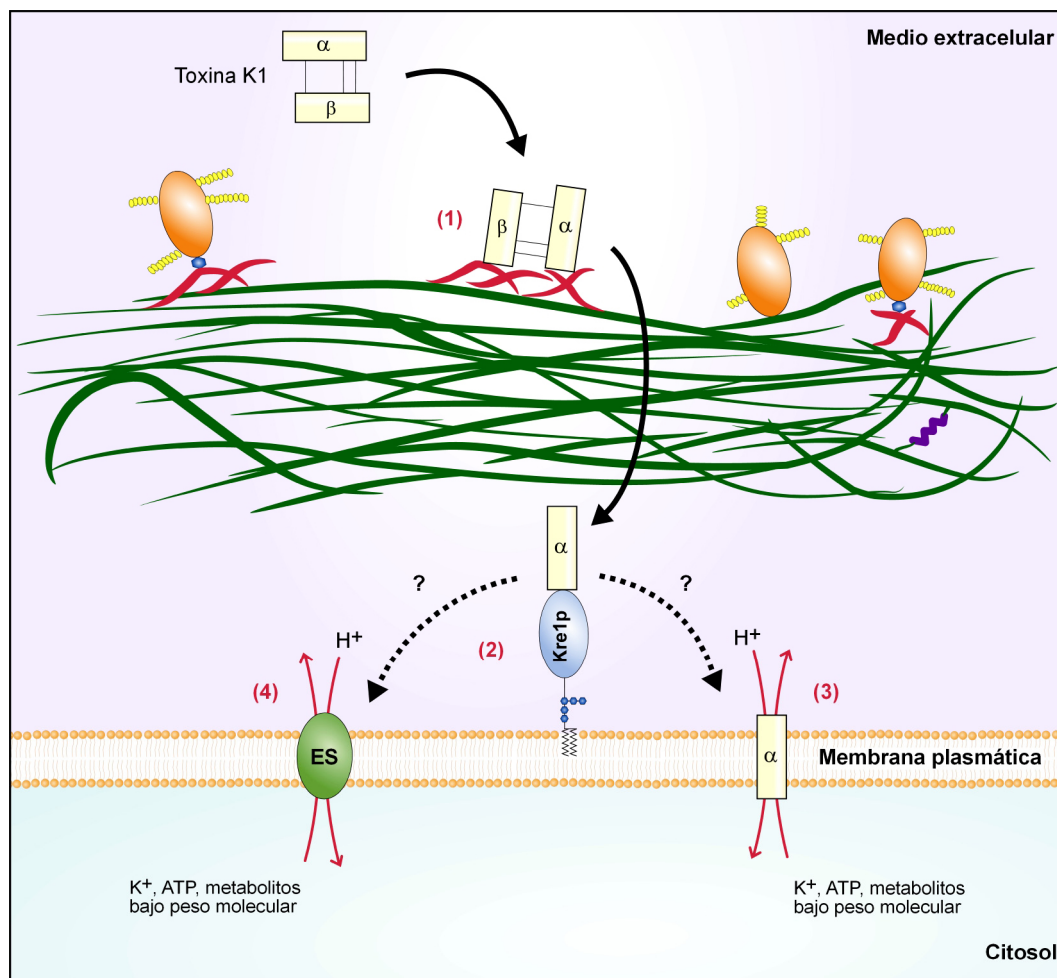
**Figura 4. Estructura de la pared celular de levaduras y distribución de sus componentes principales (Lipke & Ovalle, 1998).** (A) Representación esquemática de una unidad estructural elemental de la pared, módulo prototipo (Klis *et al.*, 1997), que incluye: una manoproteína (1), un polímero de (1→6)-β-glucanos (2) y un polímero de (1→3)-β-glucanos (3). Los residuos glicosilados (polisacáridos de manosa) (4) pueden constituir una larga ramificación lateral y encontrarse unidos a la cadena polipeptídica a través de un enlace formado entre una N-acetilglucosamina y un residuo de asparagina (N-glicosidación) y/o formar una corta ramificación lineal unida generalmente a la proteína por un enlace entre una N-acetilgalactosamina y varias serinas o treoninas (O-glicosidación). La unión de la proteína a las cadenas de (1→6)-β-glucanos está mediado por residuos remanentes del sistema de anclaje GPI (5). La quitina (6) puede encontrarse unida a los extremos no reductores de las ramificaciones de los dos tipos de glucanos, pero principalmente de los (1→3)-β-glucanos. (B) Asociación de módulos en la composición global de la arquitectura de la pared. En la capa exterior se insertan las proteínas manosiladas en contacto directo con el medio extracelular, pudiéndose encontrar proteínas GPI (7) y proteínas PIR (8). En la capa interior se encuentran los polisacáridos dispuestos como una red microfibrilar tridimensional parcialmente ordenada. En la figura también se representa la membrana plasmática y algunos de los distintos tipos de proteínas que la integran (9).

La segunda etapa del mecanismo de acción de la toxina K1 es dependiente de energía (ATP; Skipper & Bussey, 1977) e implica la translocación de K1 a la superficie de la membrana plasmática y su interacción con el receptor secundario, la proteína Kre1p (Breinig *et al.*, 2002). Se trata de una proteína O-glicosilada, localizada en la pared celular y relacionada con la síntesis de los (1→6)-β-glucanos, que durante su procesamiento a lo largo de la ruta secretora de la levadura presenta al menos un estado transitorio en el que permanece unida a la membrana plasmática a través de un anclaje tipo GPI (complejo de glucofosfolípidos) (Breinig *et al.*, 2004). Tras esta interacción, los primeros cambios fisiológicos detectados en la célula sensible por los daños ocasionados en la membrana plasmática incluyen la pérdida del gradiente electro-químico (flujo neto de salida de iones  $K^+$  al exterior) y el impedimento de los transportes acoplados de protones (acidificación del pH intracelular) y aminoácidos (de la Peña *et al.*, 1980; de la Peña *et al.*, 1981; Gásková *et al.*,

1994). Posteriormente, la membrana se vuelve permeable al ATP y otros metabolitos de bajo peso molecular (Skipper & Bussey, 1977), inhibiéndose en última instancia la síntesis de macromoléculas (Bussey & Sherman, 1973) y detectándose una reducción del volumen celular por pérdida de agua (Bussey, 1974). Actualmente, aún se desconoce si estas alteraciones son consecuencia de la formación directa de canales catiónicos transmembrana (voltaje-independientes) por inserción espontánea de K1 en la membrana plasmática (Martinac *et al.*, 1990; Bussey, 1991) o si el mecanismo de acción de la toxina podría incluir también la interacción con uno o varios efectores aún no identificados capaces de provocar la pérdida del gradiente electro-químico (Breinig *et al.*, 2002). El carácter anfipático de esta toxina (Bostian *et al.*, 1984) junto a las investigaciones llevadas a cabo por Martinac *et al.* (1990), donde se demostró la capacidad de K1 para formar canales iónicos *in vivo* en esferoplastos de levaduras sensibles e *in vitro* tras su incorporación a liposomas artificiales, estarían de acuerdo con la formación de canales debida a la inserción de K1 en la membrana (Figura 5).

Se ha comprobado que la subunidad  $\alpha$  de la toxina K1 activa presenta dos regiones altamente hidrofóbicas cerca de su extremo C-terminal (regiones 72-91 y 112-127 en la secuencia aminoacídica; apartado 1.2.1) que están separadas entre sí por una región fuertemente cargada (Bostian *et al.*, 1984; Sturley *et al.*, 1986). El hecho de que, por el contrario, la subunidad  $\beta$  sea una región fundamentalmente hidrofílica (polar), ha sugerido que el mecanismo de acción de K1 podría ser análogo al propuesto para las toxinas abrina y ricina (Olsnes & Phil, 1973). De este modo, la región  $\beta$  intervendría en el proceso de unión de la toxina a los (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -glucanos situados en la pared celular de la levadura sensible, mientras que  $\alpha$ , con una acción propiamente tóxica, mediaría la unión al receptor secundario Kre1p localizado en la membrana plasmática (Breinig *et al.*, 2002) y sería responsable, directa o indirectamente, de la formación del canal iónico transmembrana (Martinac *et al.*, 1990). El análisis por mutagénesis de ambas subunidades ha revelado que la región  $\alpha$  también interviene, junto con  $\beta$ , en la adsorción a los glucanos de la pared celular y está relacionada con procesos de auto-inmunidad (Zhu & Bussey, 1991).

Ejemplos de otras toxinas con actividad ionofórica estudiadas extensamente son: la K2 de *S. cerevisiae* (Tipper & Schmitt, 1991), la toxina producida por *Zygosaccharomyces bailii* (Zigocina; Weiler & Schmitt, 2003), la toxina de *Schwanniomyces occidentalis* (Chen *et al.*, 2000), las toxinas de *Torulopsis glabrata* (Bussey & Skipper, 1975), la toxina KP6 de *Ustilago maydis* (Li *et al.*, 1999), la toxina SMKT de *Pichia farinosa* (Suzuki & Shimma, 1999), la toxina producida por *P. kluyveri* (Kagan, 1983; Middelbeek *et al.*, 1980) y la toxina PMKT de *P. membranifaciens* (Santos *et al.*, 2004a).



**Figura 5. Mecanismo de acción citotóxica propuesto para la toxina K1 de *S. cerevisiae* (Breinig *et al.*, 2002, 2004).** La actividad *killer* se inicia con la unión de K1 a sus receptores primarios localizados en la pared celular de la cepa sensible, los (1→6)-β-glucanos (1). En esta etapa la toxina se concentra en la superficie de la célula. Posteriormente, la subunidad α es translocada a la membrana plasmática donde interacciona con su receptor secundario, la proteína Kre1p (2). Tras esta interacción, los cambios fisiológicos detectados en la levadura sensible incluyen la salida de iones  $K^+$ , ATP y otros metabolitos de bajo peso molecular y la entrada de iones  $H^+$  (acidificación del pH intracelular). Estas alteraciones podrían ser consecuencia de la formación de canales catiónicos transmembrana (voltaje-dependientes) por inserción espontánea de la subunidad α en la membrana plasmática (3) o de la interacción de α con uno o varios efectores secundarios (ES) aún no identificados (4).

#### 1.4.2 Mecanismo de acción de la toxina K28 de *S. cerevisiae*

Aunque el proceso de interacción de la toxina K28 con la célula sensible es similar al de la toxina K1, distinguiéndose dos etapas bien diferenciadas que implican su unión a receptores específicos, se ha comprobado que el mecanismo de acción de ambas toxinas es muy diferente (Tipper & Schmitt, 1991). Tras su secreción, K28 se une a la fracción manoproteica de la pared celular en la cepa sensible (receptor primario; Schmitt & Radler, 1987, 1988) y es posteriormente translocada a la superficie de la membrana plasmática para mediar su interacción con el receptor secundario. Aunque la identidad de este receptor de membrana aún no ha sido determinada (Breinig *et al.*, 2002), su existencia parece haberse demostrado gracias a los estudios de sensibilidad en esferoplastos llevados a cabo por Boone *et al.* (1990) y Meaden *et al.* (1990). Tras la unión al receptor secundario, la toxina es

internalizada en la célula sensible por endocitosis y es conducida al citosol a través de la ruta secretora de la levadura en sentido inverso, dependiendo este transporte retrógrado de la presencia del motivo HDEL en el extremo C-terminal de la subunidad  $\beta$  de la toxina (apartado 1.2.2) (Figura 6, A) (Eisfeld *et al.*, 2000). Después de atravesar el aparato de Golgi y llegar hasta el retículo endoplasmático, la chaperona Kar2p presente en el lumen del retículo promueve la salida de la toxina al citosol a través del complejo proteico Sec61p (Eisfeld *et al.*, 2000; Breinig *et al.*, 2006). En el citosol, la subunidad  $\beta$  de la toxina K28 es marcada por la ubiquitina para posteriormente ser degradada en el proteosoma, mientras que la subunidad  $\alpha$  entra en el núcleo. Aunque se ha demostrado que la entrada de la subunidad  $\alpha$  en el núcleo puede ocurrir por difusión pasiva debido a su masa molecular de 10,5 kDa (Schmitt *et al.*, 1996), es posible que algún tipo de complejo proteico o proteína transporte, como son las importinas, estén implicadas en el proceso (Schmitt & Breinig, 2006). En el interior del núcleo, la subunidad  $\alpha$  interacciona con proteínas específicas que son esenciales para el control del ciclo celular, bloqueando irreversiblemente la síntesis de ADN (Schmitt *et al.*, 1996). Se ha comprobado que, tras el tratamiento con la toxina K28, las células sensibles permanecen detenidas en la fase S del ciclo celular, observándose yemas de división nacientes pero con un único núcleo localizado en la célula madre y el ADN sin replicar (n) (Figura 6, B) (Schmitt *et al.*, 1989; Schmitt & Tipper, 1990; Schmitt *et al.*, 1996).

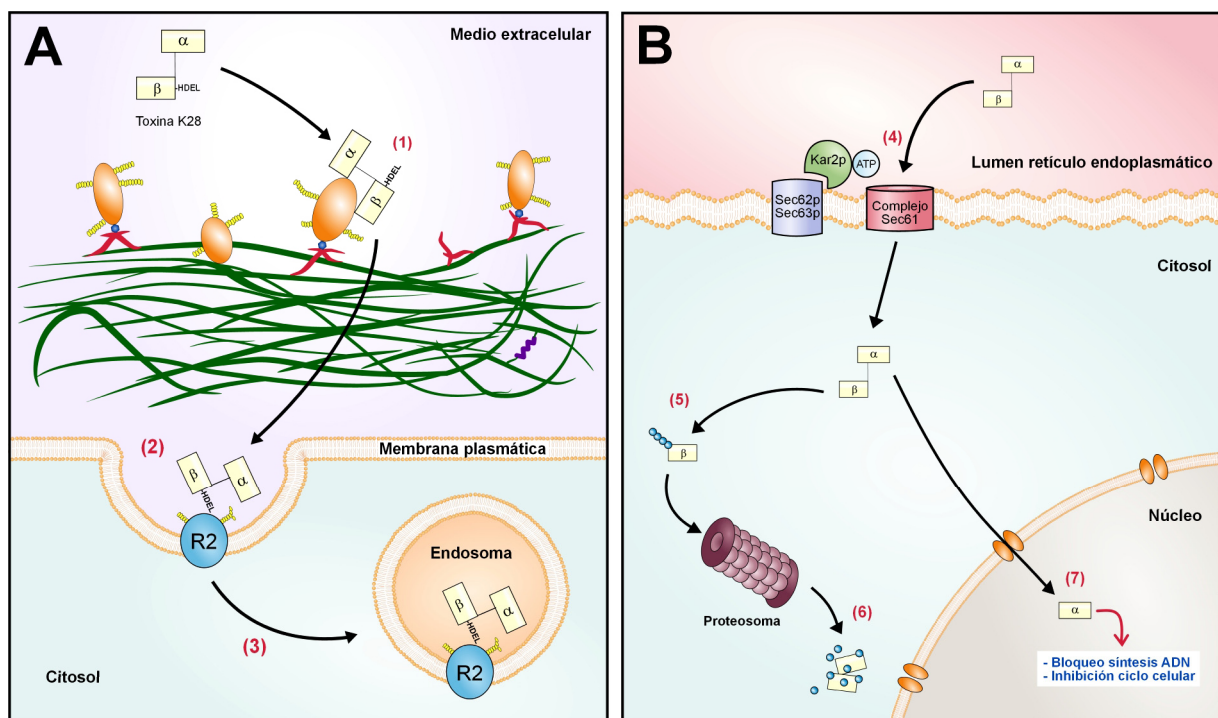
La toxina producida por *Kluyveromyces lactis* (zimocina) muestra un mecanismo de acción en parte similar al de la K28 de *S. cerevisiae*. Aunque se trata de toxinas muy diferentes desde el punto de vista bioquímico, estructural y funcional (Stark *et al.*, 1990; Butler *et al.*, 1991; Takita & Castilho-Valavicius, 1993; Jablonowski *et al.*, 2001), el tratamiento con la zimocina provoca, mediante actividad ARNt-asa (Studte *et al.*, 2008), el bloqueo de la células sensibles en la fase G1 del ciclo celular, observándose células sin dividir con el ADN sin replicar en su interior (White *et al.*, 1989; Butler *et al.*, 1991).

En cuanto a las toxinas cuyos mecanismos de acción se basan en sus propiedades enzimáticas para alterar componentes específicos de la pared celular, se pueden destacar: la toxina K5 de *Pichia anomala*, que muestra actividad (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -exoglucanasa (Izgü *et al.*, 2005); la toxina KpKt producida por *Kluyveromyces phaffii*, con actividad  $\beta$ -glucanasa; y las toxinas WmKT y HM-1 secretadas por distintas cepas de *Williopsis saturnus* var. *mrakii* que muestran, respectivamente, actividad  $\beta$ -glucanasa (Guyard *et al.*, 2002) y la capacidad de inhibir *in vitro* la actividad (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucano sintasa (Takasuka *et al.*, 1995).

Independientemente del tipo de mecanismo de acción en el que una toxina basa su actividad *killer*, parece haberse demostrado la capacidad de éstas para mediar tanto procesos de lisis como apoptóticos en la célula sensible. De este modo, empleándose las



toxinas K1 y K2 de *S. cerevisiae* y la toxina de *Z. bailii* (zigocina), Reiter *et al.* (2005) comprobaron que la inducción de un tipo u otro de muerte celular dependía directamente de la concentración de toxina a la que la célula sensible era expuesta. El tratamiento con bajas concentraciones de cualquiera de las tres toxinas indujo la aparición de los cambios fenotípicos propios de la apoptosis, pudiéndose observar la condensación de la cromatina, la fragmentación del ADN y, en el caso de la toxina K28, la translocación de fosfatidilserina desde la cara interna de la membrana plasmática a la cara externa. Estos cambios estaban mediados por la actividad de la caspasa Yca1p y por la presencia de ROS (*Reactive Oxygen Species*). El tratamiento de las células sensibles con una dosis más elevada de cualquiera de las tres toxinas indujo un proceso de lisis independiente de Yca1p y ROS. Teniendo en cuenta estas observaciones, es posible que en el medio ambiente, donde la cantidad de toxina secretada por la cepa productora es normalmente baja o moderada (Starmer *et al.*, 1987), la inducción de la apoptosis juegue un papel importante en el establecimiento de la muerte de la célula sensible (Reiter *et al.*, 2005).



**Figura 6. Mecanismo de acción de la toxina K28 de *S. cerevisiae*.** (A) La actividad *killer* se inicia con la unión de K28 a la fracción manoproteica de la pared celular (1) (en la figura se ha representado la unión de la toxina a una proteína GPI, pero igualmente este proceso podría llevarse a cabo a través de una proteína Pir). A continuación, la toxina es translocada a la superficie de la membrana plasmática donde interacciona con su receptor secundario (R2), aún no identificado (2) (Breinig *et al.*, 2002). Posteriormente, K28 es internalizada en la célula sensible por endocitosis (2) y es conducida al citosol a través de la ruta secretora de la levadura en sentido inverso (3), dependiendo este transporte retrógrado de la presencia del motivo HDEL en el extremo C-terminal de la subunidad  $\beta$  de la toxina. (B) Tras atravesar el aparato de Golgi y llegar hasta el retículo endoplasmático, la salida de la K28 al citosol se lleva a cabo a través del complejo proteico Sec61p (4). Las proteínas Sec62p y Sec63p (subunidades esenciales del complejo Sec63) intervienen en la salida de la toxina al citosol, dependiendo esta acción de la actividad ATPasa de la chaperona Kar2p localizada en el lumen del retículo endoplasmático (Young *et al.*, 2001; Willer *et al.*, 2003; Eisfeld *et al.*, 2000). En el citosol, la subunidad  $\beta$  es ubiquitinada (5) y degradada en el complejo proteosoma (6), mientras que la subunidad  $\alpha$  entra en el núcleo (7). En el interior del núcleo, la subunidad  $\alpha$  interacciona con proteínas específicas que son esenciales para el control del ciclo celular, bloqueando irreversiblemente la síntesis de ADN.



## 1.5 Toxinas *killer* del género *Pichia*

El género *Pichia* representa actualmente uno de los géneros más amplios de levaduras, compuesto por 91 especies diferentes, y uno de los más heterogéneos (Kurtzman, 1984). Las levaduras pertenecientes a este género están ampliamente distribuidas en la naturaleza y en distintos tipos de ambientes artificiales, pudiendo ser aisladas de suelo, agua, exudados de plantas, fruta e insectos (Van der Walt & Scott, 1971; Nakase *et al.*, 2007; Bhadra *et al.*, 2007; Rocha *et al.*, 2007; Ponzoni *et al.*, 2008), o como contaminantes de ciertos tipos de alimentos (Araújo *et al.*, 2003; Ancasi *et al.*, 2006; Conte *et al.*, 2007; Hamad, 2008). En la industria de la alimentación, la utilización de algunas de estas especies ha contribuido al correcto procesamiento de distintos tipos de quesos y al desarrollo apropiado de etapas tempranas en la maduración de ciertos vinos (Corsetti *et al.*, 2001; Erten & Campbell, 2001; Rantsiou *et al.*, 2008; Viana *et al.*, 2008). Desde el punto de vista clínico, algunas especies del género *Pichia* presentan gran interés como agentes causantes de micosis oportunistas (Anaisse *et al.*, 1989; Bergman *et al.*, 1998; Chakrabarti *et al.*, 2001; Puerto *et al.*, 2002; Taj-Aldeen *et al.*, 2006; Adler *et al.*, 2007).

Dentro del género *Pichia* se han estudiado las toxinas *killer* producidas por varias especies, entre las que cabe destacar: *P. acaciae* (McCracken *et al.*, 1994; Klassen *et al.*, 2004, 2006, 2007, 2008; Paluszynski *et al.*, 2007), *P. anomala* (Sawant *et al.*, 1988, 1989; Izgü *et al.*, 2005, 2007), *P. farinosa* (Suzuki & Nikkuni, 1994; Suzuki *et al.*, 1997, 2001; Suzuki, 1999), *P. fermentans* (Pfeiffer & Radler, 1984), *P. inositovora* (Hayman & Bolen, 1991; Klassen & Meinhardt, 2003), *P. kluyveri* (Middelbeek *et al.*, 1879, 1980; Zorg *et al.*, 1988; Pintar & Starmer, 2003) y *P. membranifaciens* (Santos *et al.*, 2000; Santos *et al.*, 2004; Santos & Marquina, 2004a, 2004b). A pesar de que la mayoría de ellas son únicamente activas a valores de pH ácidos, el resto de las características descritas de estas toxinas parecen tener mucha menor relación entre sí (Tabla 3).

### 1.5.1 *Pichia membranifaciens* y su toxina *killer* PMKT

*P. membranifaciens* se aisló por primera vez de un exudado de olmo en 1888 (Hansen, 1888). Inicialmente incluida dentro del género *Saccharomyces*, esta levadura, caracterizada por la formación de pseudomicelio abundante, esporas en forma de sombrero o de ángulos irregulares y metabolismo estrictamente oxidativo, se reclasificó dentro del género *Pichia* en 1904 (Hansen, 1904). A lo largo de los años, distintos estudios morfológicos y fisiológicos han determinado el marcado carácter heterogéneo de la especie (Lodder & Kreger-van Rij, 1952; Kurtzman, 1984; Barnett *et al.*, 1990), confirmándose su

**Tabla 3** Características de los principales sistemas *killer* de levaduras pertenecientes al género *Pichia*.

Cepa <i>killer</i>	Subunidades (No.)	Masa molecular (kDa)	Glicoproteína	Base genética	Receptor primario	Modo de acción	Aplicación
<i>Pichia acaciae</i> <b>PaT</b>	3 ( $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ )	110; 39; 38	?	ADNdc (pPac1-2)	Quitina	Inhibición del ciclo celular en fase S y rotura de la doble hebra de ADN; Actividad ARNt-asa	?
<i>P. anomala</i> <b>Panomicocina</b>	1	49	Si	?	(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucanos	Hidrólisis de (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucanos en células sensibles	Control de hongos filamentosos en madera. Control de <i>C. albicans</i> , <i>P. carinii</i> y <i>C. neoformans</i>
<i>P. farinosa</i> <b>SMKT</b>	2 ( $\alpha$ , $\beta$ )	6,3; 7,7	Si	Cromosoma	?	Incremento de la permeabilidad de MP a iones	?
<i>P. inosifovora</i>	?	> 100	?	ADNdc (pPin1-3)	Quitina	Posible inhibición del ciclo celular a nivel de la fase G1	?
<i>P. kluyveri</i>	?	19	Si	Cromosoma	?	Formación de canales iónicos en MP	?
<i>P. membranifaciens</i> <b>PMKT</b>	1	18	No	Cromosoma	(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucanos	Formación de canales iónicos en MP	Control de <i>Botrytis cinerea</i> en viñas y manzanas recolectadas

MP, membrana plasmática; ?, datos no conocidos o no disponibles en la bibliografía.

compleja identidad taxonómica y la de su estado imperfecto, *Candida valida* (van Uden & Buckley, 1970), mediante la realización de diversos estudios genéticos (Mikata & Ueda-Nishimura, 2000; Villa-Carvajal *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2006). Se trata de una levadura aislada habitualmente como contaminante de ciertos alimentos (Heard & Fleet, 1987; Noronha-da-Costa *et al.*, 1995) que aparece frecuentemente en los procesos de fermentación de aceitunas en salmuera (Marquina *et al.*, 1992; Kotzekidou, 1997; Hernández *et al.*, 2006). Su carácter *killer* fue descrito por primera vez en estos ambientes por Marquina *et al.* (1992, 1997), comprobándose que tanto su espectro de acción como su toxicidad aparente se incrementaban por la presencia de cloruro sódico en el medio (Llorente *et al.*, 1997). La cepa *P. membranifaciens* CYC 1106 fue particularmente activa y resultó ser una de las especies dominantes del total de levaduras *killer* aisladas de las salmueras, produciendo la mayor inhibición en el crecimiento de la cepa sensible *Candida boidinii* IGC 3430. De este modo, *P. membranifaciens* CYC 1106 se utilizó posteriormente para llevar a cabo la caracterización físico-química de la única toxina hasta entonces descrita en la especie, PMKT (*Pichia membranifaciens* Killer Toxin) (Santos & Marquina 2004b). Se trata de una toxina de naturaleza proteica, monomérica, de 18 kDa de masa molecular, que no presenta residuos de glicosidación cuando se encuentra en forma activa y está codificada en el cromosoma de la levadura (Santos & Marquina, 2004b). Su punto isoeléctrico aproximado es de 3,9 y muestra actividad a valores de temperatura inferiores a 20 °C y a valores de pH ácidos menores a 4,8 (Santos *et al.*, 2000). Además de poder establecerse ciertas semejanzas con algunas toxinas producidas por levaduras pertenecientes al mismo género, como la de *P. kluyveri* o la de *P. fermentans* (Middiebeek *et al.*, 1979; Pfeiffer & Radler, 1984), estas características han resultado ser prácticamente idénticas a las de las toxinas producidas por *H. uvarum* (Radler *et al.*, 1990) y las de la toxina K2 de *S. cerevisiae* (Young & Yagiu, 1978).

Los primeros estudios para caracterizar el mecanismo de acción de PMKT se llevaron a cabo por los autores Santos y Marquina (Santos & Marquina, 2004a), empleando nuevamente la cepa *Candida boidinii* IGC 3430 como levadura sensible. Se ha comprobado que PMKT tiene afinidad por los (1→6)- $\beta$ -glucanos presentes en la pared celular de la levadura sensible (receptor primario) y que esta interacción tiene lugar durante los 2-3 primeros minutos tras la adición de la toxina (Santos *et al.*, 2000). La viabilidad de la célula sensible no sufre ningún cambio aparente hasta aproximadamente una hora después, definiéndose así una fase de latencia que podría reflejar el desarrollo de un proceso subsecuente a la propia interacción toxina-receptor primario, como pudiera ser el establecimiento de interacciones con receptores secundarios, las alteraciones que constituyeran el mecanismo de acción específico de la toxina y la posible respuesta de la

cepa sensible a la acción citotóxica de la toxina (Kotani *et al.*, 1977; Santos & Marquina, 2004a). Tras la interacción, se ha comprobado que la toxina *killer* resulta ser, directa o indirectamente, responsable de los siguientes cambios fisiológicos en la célula sensible: primero, la acidificación del pH intracelular después de 30 minutos de tratamiento, que podría afectar al estado de estrés de la célula sensible sin comprometer su viabilidad; segundo, la pérdida de iones  $K^+$  a partir de 1-1,5 horas, que prácticamente agota las reservas intracelulares de  $K^+$  tras tres horas; y tercero, la entrada de iones  $Na^+$  tras una hora de exposición a la toxina. La hipótesis más probable que explica este desequilibrio electroquímico supone un incremento de la permeabilidad en la membrana plasmática de la célula sensible a estos iones ( $Na^+$ ,  $K^+$  y  $H^+$  en el caso de la acidificación del pH) y posiblemente a otros. Así, de forma similar a lo que sucede con la toxina K1 de *S. cerevisiae* (Kagan, 1983; Martinac *et al.*, 1990), se ha propuesto que el mecanismo de acción de PMKT podría estar basado en la capacidad de la toxina para formar canales iónicos no regulados en la membrana plasmática, incapaces de discriminar entre los iones fisiológicos más comunes según la siguiente secuencia:  $K^+ > Na^+ > Li^+ > Ca^+ > Cl^-$  (Santos & Marquina, 2004a). Este hecho podría justificar además el aumento de la actividad aparente de la toxina que se observa por la presencia de NaCl en el medio extracelular, que contribuiría de forma directa en la alteración del equilibrio iónico en la cepa sensible (Llorente *et al.*, 1997).

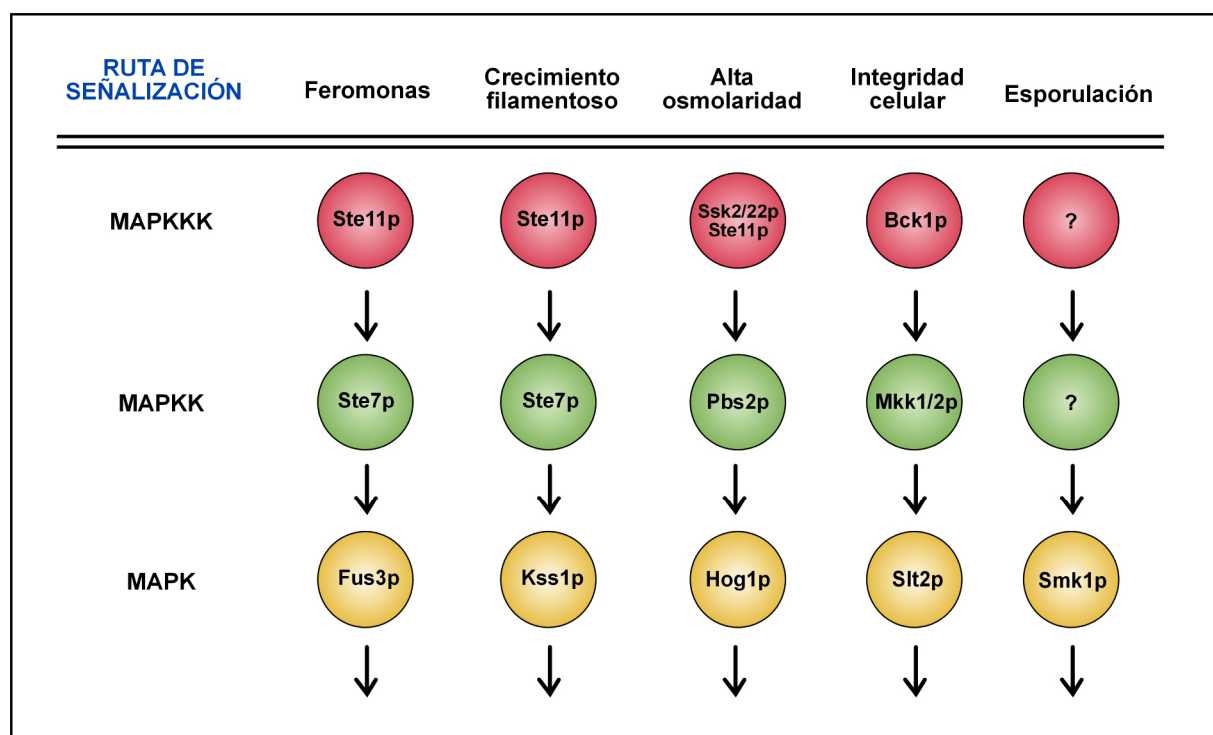
Se ha demostrado que la integridad física de la membrana plasmática de la célula sensible sólo se ve afectada cuando el proceso de intoxicación por PMKT está claramente avanzado, pudiendo ser entonces las alteraciones derivadas de esa pérdida de integridad la última consecuencia de la muerte celular inducida por la toxina (Santos & Marquina, 2004a). Por ello, se ha sugerido que tras la alteración del gradiente electroquímico y subsecuente despolarización de la membrana plasmática de la levadura sensible, la pérdida de ciertos metabolitos y moléculas de alto peso molecular podría ser consecuencia de la formación de poros (canales no selectivos) en la membrana, de forma secuencial o simultánea con la formación de los canales iónicos no regulados (Kagan, 1983; Kurzweilová & Sigler, 1995; Santos & Marquina, 2004a). De este modo, y habiéndose comprobado que la toxicidad mediada por PMKT no conduce a una alteración del ciclo celular en la levadura sensible (Santos & Marquina, 2004a), se ha admitido que el mecanismo de acción específico de la toxina muestra una gran homología con la actividad ionofórica desarrollada por la toxina K1 de *S. cerevisiae* (Skipper & Bussey, 1977; de la Peña *et al.*, 1981; Martinac *et al.*, 1990).

## 1.6 Rutas de señalización celular mediadas por MAPKs como respuesta adaptativa a cambios en el entorno

La supervivencia de una levadura en el medio ambiente depende de su capacidad de adaptación y respuesta a las modificaciones de los factores físico-químicos de este. Generalmente, las condiciones adversas que comprometen la viabilidad celular incluyen cambios bruscos de temperatura (choque térmico), estrés oxidativo, alteraciones en los niveles de osmolaridad, pH extremos, disponibilidad limitada de nutrientes, alta concentración de metales pesados y/o sustancias xenobióticas, y la presencia de diversas toxinas secretadas por plantas, hongos (filamentosos o levaduras) y bacterias. El desarrollo de mecanismos de señalización capaces de detectar y transmitir esos estímulos ambientales al interior celular constituye la primera etapa en la generación de una respuesta adecuada (Gustin *et al.*, 1998; Shitamukai *et al.*, 2004). Algunos de estos mecanismos implican la activación secuencial de distintos tipos de proteínas pertenecientes a la superfamilia de las MAP quinasas (MAPKs) (ej: Seth *et al.*, 1992; Levin & Errede, 1995; O'Rourke & Herskowitz, 1998; Posas *et al.*, 1998; Igual & Estruch, 2000; Levin, 2005; Hersen *et al.*, 2008), transmitiéndose generalmente la señal al núcleo donde tienen lugar los cambios en la expresión génica de la levadura (Banuett, 1998). Estas cascadas de señalización celular MAPK, conservadas en todos los organismos eucariotas (Cooper, 1994; Marshall, 1994; Errede *et al.*, 1995; Herskowitz, 1995; Hirt, 1997; Robinson & Cobb, 1997), se estructuran en módulos que funcionan como unidades físicamente estables en los que generalmente se puede encontrar: una MAPKKK (MAP quinasa-quinasa-quinasa), una MAPKK (MAP quinasa-quinasa) y una MAPK (Marshall, 1994; Cobb & Goldsmith, 1995). Cada una de ellas activaría a la siguiente por fosforilación (MAPKKK→MAPKK→MAPK) y la señal extracelular, captada por diversos receptores, se transmitiría al interior para activar otras cascadas de respuesta específica, entre las que se pueden incluir factores de transcripción u otros sistemas reguladores del material genético (Gille *et al.*, 1992; Seth *et al.*, 1992), diversas enzimas (quinasas o no) (Cook *et al.*, 1996) y proteínas del citoesqueleto (Cobb & Schaefer, 1996). La gran diversidad de estímulos extracelulares que culminan con la activación de un módulo MAPK indica que las enzimas quinasa que lo componen no funcionan con dedicación exclusiva a un único tipo señal. Así mismo, la fidelidad que se mantiene a la hora de traducir señales extracelulares específicas en respuestas fisiológicas concretas refleja la adaptación selectiva de dichos módulos (Cobb & Schaefer, 1996).

Diversos estudios han demostrado que en *S. cerevisiae* existen cinco cascadas de señalización MAPK (Hunter & Plowman, 1997) que intervienen, respectivamente, en: primero, la respuesta a feromonas propias de los procesos de conjugación y otros factores

relacionados con la conjugación; segundo, la regulación de los fenómenos de filamentación/invasión; tercero, el mantenimiento de la integridad celular; cuarto, la respuesta adaptativa a condiciones de alta osmolaridad del medio; y quinto, el ensamblaje de la pared de la espora que, a diferencia de los casos anteriores, no está presente en el crecimiento de la forma vegetativa y aparece como mecanismo de regulación de los procesos de desarrollo durante la esporulación (Gustin *et al.*, 1998) (Figura 7). Aunque ninguna de estas rutas comparte las señales de activación y la respuesta fisiológica que cada una de ellas procesa resulta diferente, la interacción entre los distintos módulos MAPKs durante los procesos de señalización celular parece haberse comprobado (ej: Davenport *et al.*, 1995; Hall *et al.*, 1996; O'Rourke & Herskowitz, 1998). Esta interacción cruzada entre módulos, junto a otros factores intrínsecos (especificidad de sustrato de las MAP quinasas, interacción proteína-proteína, localización subcelular, presencia de fosfatasas capaces de mediar procesos de defosforilación, etc.; Schwartz & Madhani, 2004), es la responsable del establecimiento y mantenimiento de la alta especificidad mostrada durante la transducción de señales en *S. cerevisiae* (Cobb & Schaefer, 1996; Davenport *et al.*, 1999).



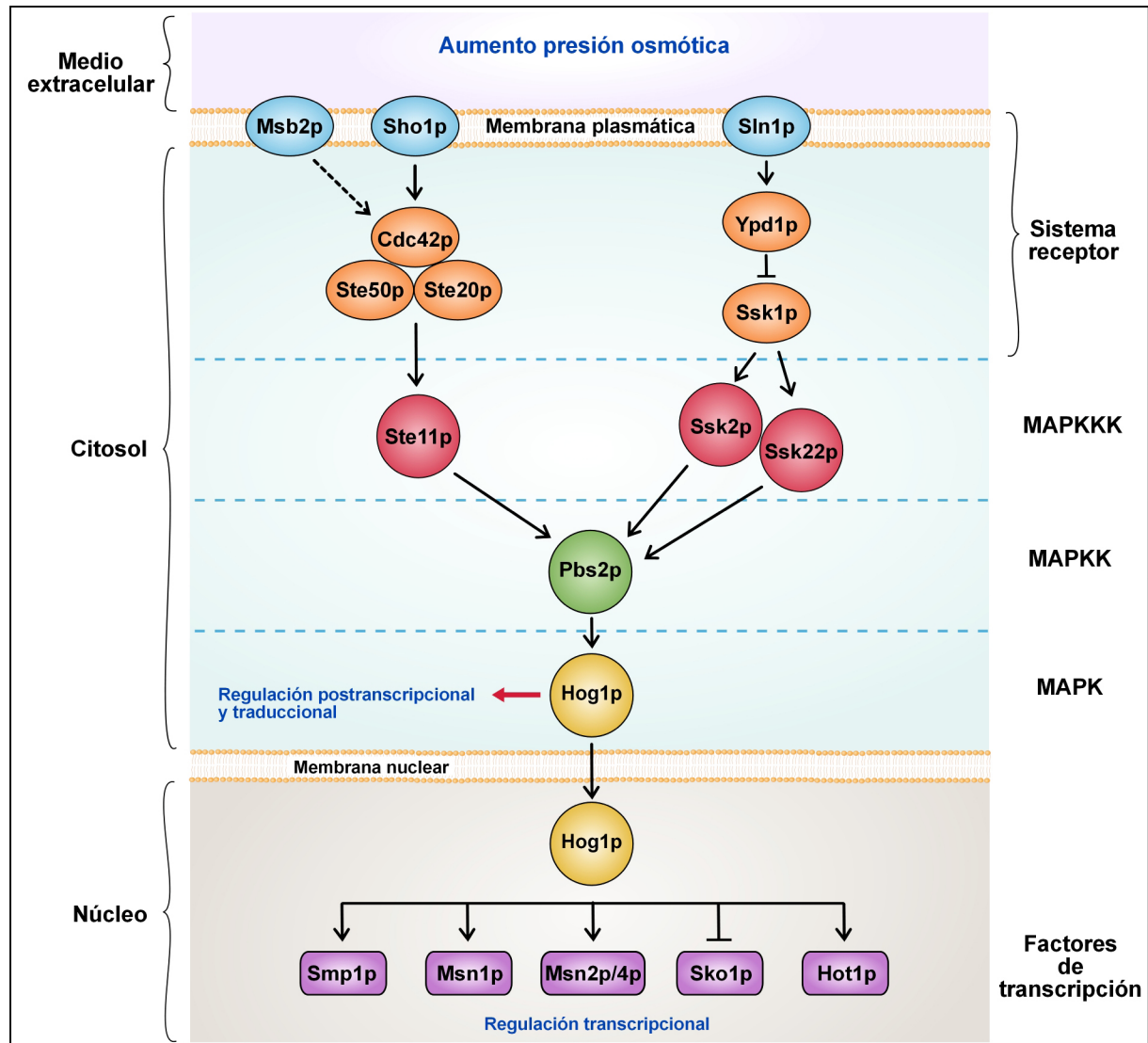
**Figura 7. Esquema de las rutas de transducción de señales MAPK en *S. cerevisiae*.** Actualmente se han identificado cinco rutas de transducción diferentes, cuatro presentes en las células vegetativas (feromonas, crecimiento filamentososo, alta osmolaridad e integridad celular) y una, relacionada con el ensamblaje de la pared de la espora, presente exclusivamente en células que se encuentran en estado de esporulación. Las diferentes categorías de proteínas quinasas (MAPKKK, MAPKK y MAPK) aparecen representadas en colores específicos (rojo, verde y amarillo, respectivamente). Cada cascada presenta una MAPK diferente a la de cualquier otra, sin embargo ciertas quinasas pueden intervenir en más de una ruta distinta: la MAPKK Ste7p (dos rutas) y la MAPKK Ste11p (tres rutas). Las flechas representan el sentido en el que la señal se transmite a lo largo de la ruta. El símbolo “?” indica que la proteína presente a ese nivel en la cascada de transducción aún no ha sido identificada.

Los estudios de expresión génica desarrollados en este trabajo revelaron que el tratamiento de la levadura sensible *S. cerevisiae* Hansen BY4743 con la toxina PMKT de *P. membranifaciens* CYC 1106 provocaba, entre otros efectos, la activación ruta HOG mediante la fosforilación de la proteína Hog1p. Por ello, a continuación se resumen los componentes, características y funciones más relevantes de dicha ruta.

### 1.6.1 Principales características de la ruta HOG en *S. cerevisiae*

Cuando la levadura *S. cerevisiae* es expuesta a condiciones hiperosmóticas en el medio extracelular se pone en marcha una respuesta adaptativa cuyo propósito principal es restablecer la presión de turgor alterada por la pérdida de agua (Hohmann, 1997), reensamblar el citoesqueleto polarizado (Chowdhury *et al.*, 1992), reparar el daño celular y reanudar los procesos de crecimiento (Gustin *et al.*, 1998; Alexander *et al.*, 2001; Belli *et al.*, 2001; Hohmann, 2002). El control de esta respuesta depende en gran medida de la activación de una ruta de señalización MAPK llamada HOG (Gustin *et al.*, 1998) (Figura 8), que modula la transcripción de los genes inducidos específicamente por este tipo de estrés (estrés osmótico) y que activa el metabolismo del glicerol para promover su síntesis y acumulación en el interior celular (Davis, 1993; Posas *et al.*, 2000; Rep *et al.*, 2000).

Existen dos sistemas de receptores principales localizados en la membrana plasmática de la levadura que son responsables de detectar las variaciones en los niveles de osmolaridad del medio extracelular (Brewster *et al.*, 1993; Ota & Varshavsky, 1993; Maeda *et al.*, 1994). En condiciones normales, cuando la presión osmótica permanece constante, la proteína Sln1p está activa de forma constitutiva y fosforila a Ssk1p impidiéndose la transmisión de la señal a lo largo de la ruta (Posas *et al.*, 1996). En situaciones de estrés hiperosmótico la desactivación de Sln1p provoca la defosforilación de Ssk1p, activándose el resto de componentes de la ruta de forma secuencial por fosforilaciones sucesivas: Ssk1p→Ssk2p y Ssk22p (MAPKKKs)→Pbs2p (MAPKK)→Hog1p (MAPK) (Maeda *et al.*, 1995; Posas & Saito, 1998). El otro sistema osmosensor, Sho1p, se activa en condiciones de alta osmolaridad y fosforila a Pbs2p mediante el reclutamiento de un complejo proteico que incluye a Cdc42p, Ste20p, Ste50p y la MAPKKK Ste11p (Posas & Saito, 1997; O'Rourke & Herskowitz, 1998; Wu *et al.*, 1999; Reiser *et al.*, 2000). Las funciones de señalización desempeñadas por este último sistema podrían llevarse a cabo paralelamente gracias a la actividad de la proteína Msb2p (O'Rourke & Herskowitz, 2002) (Figura 8).



**Figura 8. Representación esquemática de la ruta de señalización celular HOG en *S. cerevisiae*.** El aumento de los niveles de osmolaridad del medio extracelular es detectado por dos sistemas sensores principales localizados en la membrana plasmática de la levadura. En condiciones normales, la proteína Sln1p (activa) reprime a Ssk1p a través de la fosforilación del intermediario Ypd1p. En situaciones de estrés hiperosmótico se produce la desactivación de Sln1p y, en consecuencia, la defosforilación de Ssk1, permitiéndose la activación secuencial de Ssk2p/Ssk22p (MAPKKs) y Pbs2p (MAPK) mediante fosforilaciones sucesivas. Por otro lado, Sho1p se activa en condiciones de alta osmolaridad y fosforila a Pbs2p a través del complejo proteico Cdc42p/Ste20p/Ste50p y la MAPKKK Ste11p. La proteína Msb2p parece ejercer una actividad como sensor parcialmente redundante a la desarrollada por Sho1p en la activación de Ste11p (representado en la figura por una flecha discontinua). La activación de la MAPK Hog1p (fosforilación de Thr y Tyr) mediante Pbs2p implica la translocación de gran cantidad de Hog1p al núcleo, donde regula la expresión de un elevado número de genes generalmente a través de la actuación de ciertos factores de transcripción específicos. Una pequeña cantidad de Hog1p activa actúa en el citoplasma a nivel postranscripcional y traduccional. Las flechas indican el sentido de transmisión de la señal hacia el interior celular.

Cuando la señal se transmite hasta la MAPK Hog1p por la doble fosforilación de un residuo de Thr y otro de Tyr, una gran cantidad de la proteína es translocada al núcleo donde se acumula e induce la transcripción de un elevado número de genes (Proft & Serrano, 1999; Posas *et al.*, 2000; Rep *et al.*, 2000; Proft *et al.*, 2001; O'Rourke & Herskowitz, 2004); mientras que otra pequeña porción permanece en el citoplasma para mediar efectos a nivel postranscripcional y traduccional que contribuyen a la osmoadaptación (Bilsland-Marchesan *et al.*, 2000; Teige *et al.*, 2001). En el núcleo, la



regulación de la expresión de estos genes por parte de Hog1p puede implicar su interacción directa con promotores específicos (Alepuz *et al.*, 2001; Proft y Struhl, 2002; Alepuz *et al.*, 2003; de Nadal *et al.*, 2004) o la activación de los factores de transcripción Msn1p, Msn2p/Msn4p, Hot1p, Smp1p y Sko1p (Schuller *et al.*, 1994; Rep *et al.*, 1999; Rep *et al.*, 2000; Proft & Struhl, 2002; Hohmann, 2002; de Nadal *et al.*, 2003). Algunos ejemplos de los genes que se sobreexpresan en respuesta a estrés hiperosmótico son *GPD1* (que codifica para la enzima glicerol-3-fosfato deshidrogenasa), *GPP2* (glicerol-3-fosfato fosfatasa), *CTT1* (catalasa T citosólica), *HSP12* (proteína de choque térmico), *YAP4* (parte de la *Yeast Activator Protein*) y *STL1* (que codifica para un transportador de glicerol localizado en la membrana plasmática), entre otros (Albertyn *et al.*, 1994; Ansell *et al.*, 1997; Causton *et al.*, 2001; Dihazi *et al.*, 2004; Eriksson *et al.*, 2000; Hohmann, 2002; Nevitt *et al.*, 2004). Su inducción conduce a un incremento rápido de los niveles intracelulares de glicerol, compensándose las pérdidas de agua durante los primeros segundos tras la exposición de la levadura al choque hiperosmótico (Blomberg & Adler, 1992). Además, la fosforilación de Hog1p supone la regulación positiva en la expresión de *ENA1* y otros sistemas de extrusión de cationes como *NHA1* (Prior *et al.*, 1996) y *SNQ2* (Miyahara *et al.*, 1996), así como sistemas de entrada de cationes entre los que cabe destacar *TRK1* (Gaber *et al.*, 1988), lo que contribuye aún más al establecimiento de la homeostasis osmótica e iónica. La activación de la ruta HOG en respuesta a los niveles elevados de osmolaridad del medio extracelular también implica, adicionalmente, la protección cruzada frente a otros tipos de estrés diferentes (Schuller *et al.*, 1994). Recíprocamente, se ha comprobado que existen otros factores capaces de desencadenar la activación de dicha ruta, como son el tratamiento con altas temperaturas (estrés por choque térmico) (Winkler *et al.*, 2002), la exposición a agentes oxidantes (estrés oxidativo) (Singh, 2000; Alonso-Monge *et al.*, 2003; Bilsland *et al.*, 2004) o la presencia de ácido cítrico (estrés ácido) (Lawrence *et al.*, 2004).

## 1.7 Aplicaciones reales y potenciales de las toxinas *killer*

En la actualidad hay descritas un gran número de aplicaciones posibles derivadas del uso de las levaduras *killer* o sus toxinas en diferentes procesos (Tabla 4). Algunas de estas aplicaciones se pueden incluir dentro de un ámbito fundamentalmente teórico dirigido sobre todo a la investigación básica, mientras que otras, con mayores perspectivas, se engloban dentro un contexto más comercial relacionado con la biotecnología (investigación aplicada). Ejemplos de las primeras pueden ser: la utilización de las levaduras *killer* y sus toxinas en biología celular como sistemas modelo para el estudio de la biosíntesis, procesamiento y

**Tabla 4** Principales aplicaciones de las levaduras *killer* y sus toxinas.

Área de investigación	Aplicación	Referencia
Biología celular	Estudios básicos de la biosíntesis, procesamiento y secreción de proteínas en eucariotas	Sossin <i>et al.</i> , 1989 Wickner, 1996
Taxonomía de levaduras	Clasificación de basidiomicetos basado en su sensibilidad a ciertas toxinas <i>killer</i>	Golubev & Boekhout, 1995 Golubev, 1998 Cerikcioglu, 2003
Estudios genéticos en levaduras	Selección de híbridos obtenidos por fusión de protoplastos	Palkova & Vodrejs, 1996
Tecnología recombinante del ADN	Vectores de clonación en la secreción efectiva de polipéptidos	Vodrejs <i>et al.</i> , 1996
Bacteriología clínica	Biotipado de bacterias patógenas	Morace <i>et al.</i> , 1989
Micología clínica	Biotipado de levaduras patógenas	Morace <i>et al.</i> , 1988, 1990 Cerikcioglu, 2003 Caprilli <i>et al.</i> , 1985 Dall'Acqua Coutinho & Rodrigues Paula, 1998
	Actividad zimocida contra levaduras patógenas de animales y humanos	Polonelli <i>et al.</i> , 1986 Cailliez <i>et al.</i> , 1994 Sawant <i>et al.</i> , 1989 Hodgson <i>et al.</i> , 1995 Buzzini <i>et al.</i> , 2004a Izgü <i>et al.</i> , 2007
	Anticuerpos anti-idiotípicos de toxinas <i>killer</i> como agentes antifúngicos	Magliani <i>et al.</i> , 1997b Selvakumar <i>et al.</i> , 2006a Cenci <i>et al.</i> , 2004 Cailliez <i>et al.</i> , 1994 Séguy <i>et al.</i> , 1994, 1997 Polonelli <i>et al.</i> , 1994
Industria de la Fermentación	Capacidad de inhibición del crecimiento de cepas contaminantes en la producción de cerveza, vino y saké	Cansado <i>et al.</i> , 1992 Comitini <i>et al.</i> , 2004 Rosini, 1984 Petering <i>et al.</i> , 1991
	Selección de cepas iniciadoras	van Vuuren & Wingfield, 1986 Seki <i>et al.</i> , 1985 Javadekar <i>et al.</i> , 1995
Tecnología de alimentos	Conservación de alimentos	Bortol <i>et al.</i> , 1986 Lowes <i>et al.</i> , 2000 Palpacelli <i>et al.</i> , 1991
Control biológico en agricultura	Actividad antifúngica contra hongos causantes de enfermedades en plantas y del deterioro de la madera	Walker <i>et al.</i> , 1995 Santos <i>et al.</i> , 2004 Santos & Marquina, 2004b
	Estabilidad aeróbica de ensilados	Kitamoto <i>et al.</i> , 1999 Lowes <i>et al.</i> , 2000

secreción de proteínas en eucariotas (Sossin *et al.*, 1989; Schmitt, 1995; Wickner, 1996); su empleo como sistemas de referencia en estudios realizados sobre el control y la expresión de ciertos virus (Wickner, 1993); las investigaciones llevadas a cabo sobre el modo de interacción toxina-receptor primario para profundizar en el conocimiento de los sistemas de

ensamblaje de la pared celular de levaduras y hongos *in vivo* (Schmitt & Breinig, 2002); y, con respecto a la tecnología recombinante del ADN, el gran potencial de uso de los plásmidos *killer* de *S. cerevisiae* y *K. lactis* como vectores de clonación en la secreción efectiva de polipéptidos (Vondrejs *et al.*, 1996). En cuanto a las aplicaciones relacionadas con la biotecnología, a continuación se resumen las más importantes.

### 1.7.1 Aplicación en la industria de la fermentación

Ciertas cepas de levaduras *killer* con buenas propiedades de fermentación se han seleccionado o construido por ingeniería genética para la producción de saké, vino y cerveza (Seki *et al.*, 1985; van Vuuren & Wingfield, 1986; Petering *et al.*, 1991; Javadekar *et al.*, 1995). Algunas de ellas son capaces de dominar el proceso de fermentación aún cuando en el inicio de esta se encuentran en baja proporción con respecto a la población global de levaduras, por lo que podrían ser utilizadas como iniciadoras (*starter*) en la fabricación y evitar simultáneamente el desarrollo de cepas sensibles contaminantes (Cansado *et al.*, 1992). Actualmente, la selección de cepas K2 de *S. cerevisiae* o la creación de fenotipos híbridos (ej. K1/K2) por fusión de protoplastos (Javadekar *et al.*, 1995) proporcionan cepas *starters* con buenas propiedades organolépticas en algunos procesos de fermentación, sobre todo del vino. La aplicación directa de extractos de toxinas *killer* en ciertas fases del proceso de fermentación o, incluso, en el producto final, podría suponer su uso potencial como conservante en determinados casos. De este modo, las toxinas producidas por *P. anomala* y *Kluyveromyces wickerhamii* presentan hoy en día un gran potencial de uso para la eliminación de cepas contaminantes de *Brettanomyces* en vinos de crianza (Comitini *et al.*, 2004). Los principales problemas que se plantean derivan del espectro de acción específico de las toxinas, que implica un número muy reducido de cepas sensibles, y de su resistencia a factores físico-químicos (sobre todo temperatura y pH), en ocasiones incompatibles con los procesos de producción industrial.

De forma similar a lo que se ha descrito anteriormente, las levaduras *killer* y/o sus toxinas podrían ser utilizadas para preservar otros alimentos de la contaminación por levaduras no deseadas. Las investigaciones más relevantes hasta la fecha incluyen: el uso de una cepa industrial modificada de *S. cerevisiae* para realizar el control de levaduras contaminantes de pan, fruta y vegetales (Bortol *et al.*, 1986); el empleo de la toxina HMK (también llamada HM-1) de *W. saturnus* var. *mrakii* (nativa o de expresión heteróloga en *Aspergillus niger*) como agente fungicida en yogurt (Lowes *et al.*, 2000); y la aplicación de la toxina de *Kluyveromyces phaffii* en el biocontrol de varias especies que habitualmente

aparecen como contaminantes en la industria alimentaria, por ejemplo *Kloeckera apiculata*, *Saccharomycodes ludwigii* y *Zygosaccharomyces rouxii* (Palpacelli et al., 1991).

### 1.7.2 Aplicación médica

Las levaduras *killer* presentan importantes aplicaciones en el campo de la medicina, utilizándose actualmente en el biotipado de las especies patógenas *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* y *Malassezia pachydermatis* (Caprilli et al., 1985; Morace et al., 1988, 1990; Dall'Acqua Coutinho & Rodrigues Paula, 1998; Cerikcioglu, 2003). El potencial de estas toxinas radica en su posible uso como agentes antimicóticos en determinadas infecciones (Cailliez et al., 1994; Polonelli et al., 1991), siendo la sensibilidad de *C. albicans* frente a las toxinas producidas por distintas cepas de *W. saturnus* var. *mrakii* y *P. anomala* el caso mejor estudiado hoy en día (Sawant et al., 1989; Hodgson et al., 1995; Walker et al., 1995; Buzzini et al., 2004a; Izgü et al., 2007). Sin embargo, la antigenicidad de las toxinas *killer*, junto a su alta inestabilidad a los pH y temperaturas fisiológicos, hacen que sean, *in vivo*, candidatas poco probables en su aplicación oral o inyectable. La solución a estos problemas podría conseguirse, por un lado, aplicando las toxinas en soluciones tampón restringiendo su uso a infecciones de la piel y las mucosas; y por otro, empleando anticuerpos anti-idiotípicos frente a las toxinas *killer*, del mismo modo que se hizo para la toxina de *P. anomala* (Cailliez et al., 1994; Séguy et al., 1994, 1996). Según estos autores, los anticuerpos anti-idiotípicos serían capaces de mimetizar la acción de la toxina en el organismo (Poljak, 1994) sin presentar los problemas de antigenicidad e inestabilidad anteriormente mencionados. Hasta el momento, su aplicación *in vivo* en ratones inmunodeprimidos parece ofrecer buenas expectativas en la profilaxis de ciertos tipos de aspergilosis pulmonar invasiva (Cenci et al., 2002), candidiasis vaginal (Polonelli et al., 1994; Magliani et al., 1997b) y pneumocistosis (Séguy et al., 1997). Además, la síntesis artificial de péptidos *killer* (KT-scFv) a partir del anticuerpo anti-idiotípico de la toxina de *P. anomala* ha resultado ser una herramienta muy útil en el control parcial *in vitro* e *in vivo* de infecciones producidas por *C. albicans* y *Cryptococcus neoformans* (Cenci et al., 2004; Polonelli et al., 2003). Recientemente, se han generado también anticuerpos anti-idiotípicos de la toxina *killer* HM-1 producida por *W. saturnus* var. *mrakii* (Selvakumar et al., 2006b). Aunque su aplicación *in vivo* aún no ha sido demostrada, se ha comprobado su capacidad *in vitro* para inhibir el crecimiento de cuatro especies de *Candida* importantes desde el punto de vista clínico (*C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. glabrata*) y otras del género *Cryptococcus* mediante el bloqueo de la actividad (1→3)-β-D-glucano sintasa (Selvakumar et al., 2006a, 2006b, 2006c).

### 1.7.3 Aplicación en estudios taxonómicos

Al igual que la resistencia/sensibilidad a las toxinas *killer* ha sido empleada para realizar una clasificación de las mismas, algunos autores han empleado la especificidad de las toxinas *killer* para su uso en taxonomía como un método rápido y eficaz capaz de aportar nuevos datos en la identificación de levaduras (Golubev & Boekhout, 1995; Golubev, 1998; Buzzini & Martini, 2001; Cerikcioglu, 2003; Buzzini *et al.*, 2004b). Las referencias a este respecto suelen estar encaminadas a la identificación de microorganismos patógenos como *C. albicans*, *C. parapsilosis* y *C. neoformans*, entre otros (Polonelli *et al.*, 1983; Morace *et al.*, 1984). Según estos estudios, las levaduras presentarían diferentes patrones de sensibilidad a distintas toxinas, lo cual podría emplearse para su identificación.

### 1.7.4 Aplicación en estudios genéticos

Del mismo modo que diferentes antibióticos son empleados habitualmente como marcadores fenotípicos en la selección de bacterias transformantes e híbridos, la resistencia/sensibilidad a la acción de las toxinas *killer* parece poder emplearse en el mismo sentido en levaduras (Young, 1981; Vondrejs *et al.*, 1996). Actualmente estos procesos parecen estar basados en la utilización de cepas parentales mutantes auxotróficas y/o deficientes en su respiración.

### 1.7.5 Aplicación en biodeterioro

Existen muy pocas referencias en las cuales se haya estudiado el posible efecto beneficioso de las levaduras *killer* en el biodeterioro de algún tipo de material o proceso industrial. Algunos autores han demostrado la capacidad de estas levaduras para inhibir el crecimiento de ciertos hongos filamentosos causantes de enfermedades en plantas y del deterioro de la madera. Las investigaciones llevadas a cabo por Walker *et al.* (1995) son quizá las que ofrecen una perspectiva más amplia de este fenómeno y las que adquieren más relevancia desde el punto de vista ambiental y agronómico, poniéndose de manifiesto la eficacia de las toxinas de *S. cerevisiae* y *P. anomala* a la hora de controlar el crecimiento de ciertos hongos como *Ophiostoma ulmi* (causante de la enfermedad del olmo alemán). De todas las especies estudiadas *S. cerevisiae* resultó ser la levadura con mayor capacidad inhibitoria, siendo activa frente a *Botrytis fabae*, *Fussarium aquiseti*, *Lentinus lepideus*, *Phytophthora infestans*, *Postia placenta*, *Rhizoctonia solani* y *Serpula lacrymans*.

En otro aspecto diferente del biodeterioro las toxinas *killer* también se han utilizado con relativo éxito. Investigaciones llevadas a cabo por Kitamoto *et al.* (1993, 1999),

demonstraron que el empleo de ciertas cepas mutantes de la levadura *killer K. lactis* (cepas PCK27, creadas por mutagénesis dirigida -gen *klpck1*- e incapaces de asimilar lactato al carecer de la enzima fosfoenol piruvato carboxiquinasa) mejoraban la estabilidad aeróbica de los ensilados. Este fenómeno se basó en la inhibición del crecimiento de ciertas cepas sensibles pertenecientes a la especie *P. anomala*, que eran capaces de degradar el ácido láctico y otros carbohidratos solubles en el agua del ensilado provocando un aumento del pH y contribuyendo al biodeterioro aeróbico. En el modelo de fermentación creado en el laboratorio, esta inhibición puso de manifiesto el uso potencial de las toxinas *killer* de *K. lactis* como agente biorremediador. Sin embargo, en condiciones naturales el empleo de estas toxinas resulta ineficaz, debido fundamentalmente a su alta especificidad (incompatible con la gran variedad de levaduras y bacterias que intervienen en el proceso de degradación) y a las condiciones físico-químicas concretas que se establecen en cada tipo de ensilado (que comprometen la estabilidad de la toxina) (Kitamoto *et al.*, 1999). En el año 2000, Lowes *et al.* (2000) demostraron *in vivo* la capacidad de la toxina HM-1 producida por *Williopsis saturnus* var. *mrakii* para retrasar la degradación aeróbica en ensilados de maíz. Tanto en su forma nativa como expresada heterológicamente en *A. niger*, la aplicación de la toxina contribuyó a una disminución del número total de levaduras contaminantes, a un incremento de la cantidad total de ácido láctico y, en consecuencia, al mantenimiento de niveles bajos de pH por más tiempo.

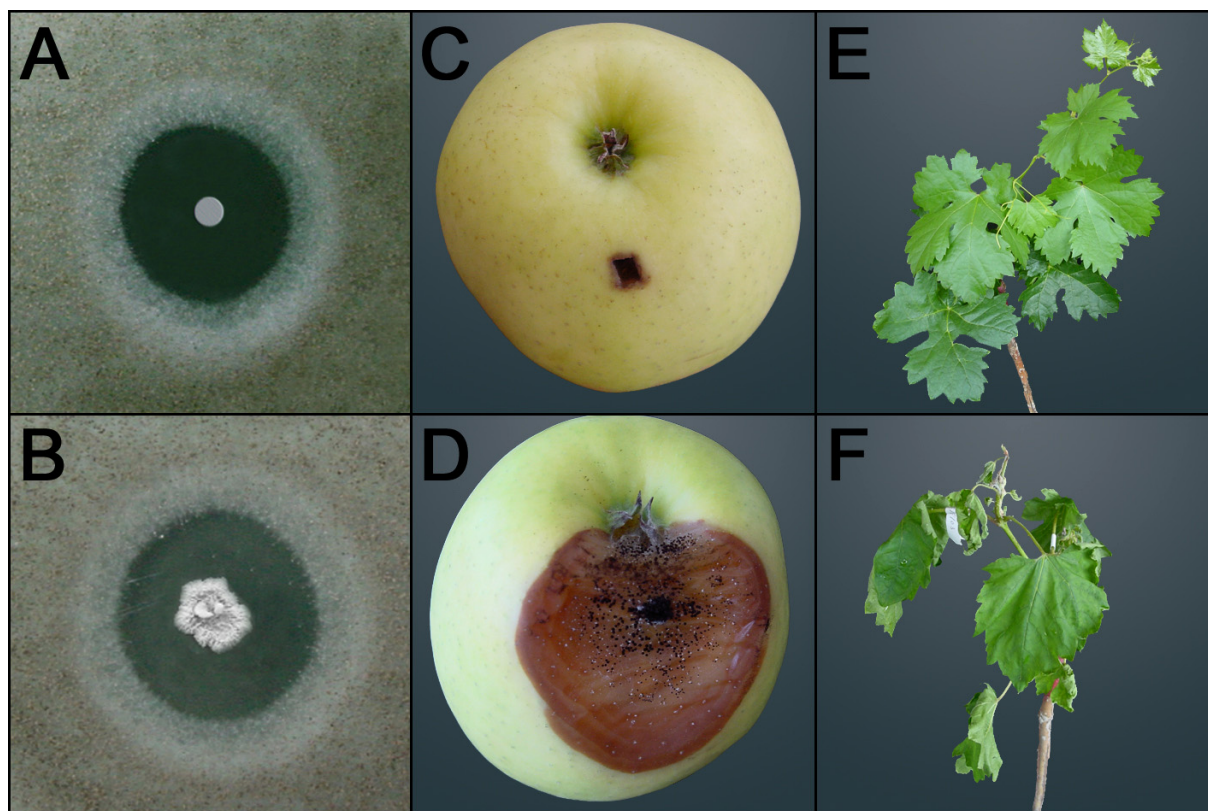
#### **1.7.6 Aplicación de la levadura *killer P. membranifaciens* CYC 1106 y su toxina PMKT en el área biotecnológica**

La aplicación potencial del carácter *killer* de *P. membranifaciens* CYC 1106 y su toxina PMKT en el campo de la biotecnología fue descrita inicialmente por nuestro grupo (Santos *et al.*, 2000). La actividad mostrada frente a la levadura sensible *Candida boidinii*, que tiene efectos negativos (actividad lipolítica y asimilación de ácido láctico) en los procesos de fermentación de aceitunas en salmuera (Marquina *et al.*, 1992), sugirió su posible uso comercial para el control de esta y otras levaduras contaminantes en aquellas fermentaciones industriales que se llevan a cabo en presencia de niveles medios o altos de sal. Investigaciones posteriores revelaron además la capacidad de *P. membranifaciens* CYC 1106 para inhibir el crecimiento del hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea* (Santos *et al.*, 2004; Santos & Marquina, 2004b), lo que amplió sus posibilidades de utilización en biodeterioro. *B. cinerea*, causante de la enfermedad del moho gris, es un hongo de distribución ubicua capaz de provocar pérdidas significativas en muchas especies de interés comercial, como por ejemplo lechuga, cebolla, patata, fresa, tomate y uvas empleadas para la elaboración de vino, entre otras (Janisiewicz, 1994; De Curtis *et al.*, 1996). Aunque hoy en día el tratamiento

con fungicidas y otros agentes químicos parece haber tenido un éxito parcial en el control de la enfermedad, el riesgo de aparición de cepas resistentes al tratamiento o la eliminación de la flora microbiana de la planta que se establece como competidora natural del hongo en la invasión son, en ocasiones, la causa de que la enfermedad curse con mayor gravedad (Beever *et al.*, 1989; Raposo *et al.*, 2000). La alternativa a estos tratamientos con agentes químicos implica el uso de agentes biológicos para controlar el daño (Janisiewicz, 1994; Nunes *et al.*, 2002). Aunque puede haber varios mecanismos implicados (secreción de enzimas que degradan la pared celular -Masih *et al.*, 2001-, competición por los nutrientes -Filonow, 1998-, predación -Lachance & Pang, 1997-, producción de siringotoxinas y siringomicinas -Woo *et al.*, 2002-, y toxinas *killer* -Walker *et al.*, 1995-), en el caso de *B. cinerea* los procesos de biocontrol por parte de levaduras pertenecientes al género *Pichia* suelen ser consecuencia de la síntesis y secreción de enzimas que muestran actividades (1→3)-β-exo- y endo-glucanasa (Droby *et al.*, 1996; Masih *et al.*, 2000, 2001; Masih & Paul, 2002). De forma diferente, las investigaciones llevadas a cabo por Santos *et al.* (2004) y por Santos & Marquina (2004b) demostraron la implicación de la toxina *killer* PMKT en la inhibición del crecimiento de ciertas cepas de *B. cinerea*. Así, tras comprobar esta capacidad de inhibición *in vitro* mediante el test de inhibición en placa empleando la levadura *killer* o su toxina purificada, fue posible controlar la propagación de la enfermedad *in vivo* cuando se estudió su desarrollo en plantas pertenecientes a la especie *Vitis vinifera* o en manzanas de la variedad *Golden Delicious*. El tratamiento de las plantas y las manzanas con una suspensión de esporas del hongo implicó el desarrollo de los síntomas típicos (marchitamiento, necrosis, reblandecimiento de los tejidos, etc.) de la enfermedad del moho gris después de varios días de incubación, mientras que el control de la invasión fue prácticamente total cuando, junto con las esporas, se inoculó una suspensión celular de *P. membranifaciens* CYC 1106. La aplicación de un extracto purificado de la toxina PMKT en lugar de las células de levadura supuso una menor inhibición del crecimiento del hongo, lo que sugería la posible implicación de otros factores (enzimas hidrolíticas o competición por los nutrientes del medio) actuando de forma sinérgica al mecanismo desarrollado por la toxina en el proceso de biocontrol (Figura 9) (Santos *et al.*, 2004; Santos & Marquina, 2004b).

Puesto que se ha comprobado que *P. membranifaciens* es una levadura incapaz de desarrollar algún tipo de actividad que implique una patología en plantas, su uso como agente para controlar en las infecciones causadas por el hongo *B. cinerea* podría ser una alternativa al tratamiento actual de biocontrol basado en el empleo de fungicidas. La síntesis y secreción de enzimas con actividad (1→3)-β-glucanasa (Masih & Paul, 2002) o la acción de la toxina PMKT (Santos *et al.*, 2004; Santos & Marquina, 2004b) podrían establecer las

bases de la investigación al posible desarrollo de esta prometedora aplicación biotecnológica.



**Figura 9. Actividad *killer* de *P. membranifaciens* CYC 1106 frente al hongo fitopatógeno *B. cinerea* (Santos & Marquina, 2004b; Santos *et al.*, 2004).** (A) Estudio de la capacidad de inhibición *in vitro* de *B. cinerea* CYC 20003 mediante el test de difusión en placa empleando la toxina PMKT purificada y (B) un inóculo de la levadura *killer*. (C) Incisión superficial en una manzana de la variedad *Golden Delicious* inoculada con una suspensión de esporas del hongo *B. cinerea* CYC 20010 ( $10^5$  esporas/ml) y una suspensión celular de *P. membranifaciens* CYC 1106 ( $5 \times 10^5$  células/ml). (D) Incisión superficial inoculada únicamente con una suspensión de esporas de *B. cinerea* CYC 20010 ( $10^6$  esporas/ml); el diámetro de la lesión se incrementa significativamente con respecto a (C). (E) Plantas de *V. vinifera* inoculadas con una suspensión de esporas del hongo *B. cinerea* CYC 20003 ( $10^5$  esporas/ml) junto con una suspensión celular de *P. membranifaciens* CYC 1106 ( $10^5$  células/ml). (F) Plantas de *V. vinifera* inoculadas únicamente con una suspensión de esporas de *B. cinerea* CYC 20003; se puede observar el desarrollo de los síntomas típicos de la enfermedad. Las fotografías (A) y (B) fueron tomadas después de tres días de incubación a 20 °C. Las fotografías (C) y (D) se hicieron después de cinco días de incubación a 18 °C y un 80% de humedad relativa. Las fotografías (E) y (F) se hicieron después de cinco días de incubación, a 20 °C, bajo un haz de luz blanca de 200  $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$  de intensidad y con un fotoperiodo de 16/8h (luz/oscuridad).



## ***2 OBJETIVOS***

Con la realización del presente trabajo se han pretendido alcanzar dos objetivos principales para, de forma general, profundizar en la caracterización del mecanismo de acción de la toxina PMKT de *Pichia membranifaciens* CYC 1106. El primero de ellos consistió en llevar a cabo un análisis de la respuesta celular asociada al tratamiento con dicha toxina. Para ello, principalmente se propuso:

1. Estudiar la cinética de muerte en la cepa sensible *Saccharomyces cerevisiae* Hansen BY4743 por acción de PMKT y analizar los perfiles de expresión génica en respuesta a la toxina mediante el empleo de PCR cuantitativa en tiempo real y *microarrays* de ADN.
2. Estudiar la sensibilidad/resistencia a PMKT mediante el empleo de mutantes de delección para genes cuya expresión se ve modificada durante la exposición a dicha toxina.
3. Determinar el estado de activación de la ruta HOG mediante el estudio de la proteína Hog1p en células sensibles, valorando paralelamente los niveles intracelulares y extracelulares de glicerol después del tratamiento con PMKT.

El segundo objetivo que se propuso fue determinar e identificar el receptor secundario de la toxina PMKT. Para ello, se planteó:

4. Estudiar de sensibilidad/resistencia a la toxina *killer* PMKT mediante el empleo de mutantes de delección para genes que codifican proteínas localizadas o relacionadas con la periferia celular, diferenciando entre protoplastos y células completas.
5. Aislar, purificar e identificar el receptor secundario de la toxina PMKT y caracterizar el proceso de interacción entre ambos.

### ***3 MATERIAL Y MÉTODOS***

### 3.1 Microorganismos

En este trabajo se utilizaron las siguientes cepas de levadura: *Pichia membranifaciens* CYC 1106 (*Complutense Yeast Collection*, Madrid), como cepa con actividad *killer*, y *Saccharomyces cerevisiae* Hansen BY4743 (*MATa/MAT $\alpha$  his3 $\Delta$ 1/his3 $\Delta$ 1 leu2 $\Delta$ 0/leu2 $\Delta$ 0 LYS2/lys2 $\Delta$ 0 MET15/met15 $\Delta$ 0 ura3 $\Delta$ 0/ura3 $\Delta$ 0*; número de catálogo 95400. BY4743, Invitrogen<sup>TM</sup>), como cepa sensible tipo. De esta última cepa, se empleó una colección de mutantes de delección sensibles (*Saccharomyces Genome Deletion Project*; <http://mips.gsf.de/projects/fungi>), obtenidos por vía comercial (Invitrogen<sup>TM</sup>; *Yeast Deletion Pools - Homozygous Diploid*, número de catálogo 95401. H1Pool), para realizar distintos estudios sobre la toxina PMKT. Por un lado, se analizó la respuesta transcripcional de la cepa sensible tipo tras su exposición a la toxina, seleccionando mutantes en función de los niveles de expresión obtenidos para cada gen mediante el empleo de *microarrays* de ADN y Q-RT-PCR. Y por otro lado, se procedió a la identificación del receptor de membrana plasmática de la toxina, seleccionando en este caso los mutantes de genes que codificaban proteínas localizadas o relacionadas con la periferia celular según SGD (*Saccharomyces cerevisiae Genome Database*; <http://www.yeastgenome.org/>). En ambos casos, todas aquellas delecciones génicas cuya selección comprometía la viabilidad celular de los mutantes obtenidos (*Saccharomyces Genome Deletion Project*) se descartaron. Los mutantes diploides homocigotos empleados fueron BY4743, *orf $\Delta$ ::kan MX4/orf $\Delta$ ::kan MX4*.

### 3.2 Mantenimiento de los microorganismos

Las levaduras empleadas se mantuvieron en tubos con medio YMA (*Yeast Morphology Agar*) en bisel a una temperatura de 20 °C, realizando resiembras de los microorganismos periódicamente. En el caso de los mutantes de delección se procedió del mismo modo, utilizando el medio YMA suplementado con glicerol al 15% (v/v), 200 mg/l de G418 (geneticina) y un 2% de agar.

La conservación de las cepas durante largos periodos de tiempo se realizó en nitrógeno líquido (-196 °C), utilizando glicerol al 10% como crioprotector.

### 3.3 Medios de cultivo

La composición y esterilización de los medios de cultivo empleados durante el desarrollo experimental se describe en los apartados siguientes.

### 3.3.1. Medios de mantenimiento

#### 3.3.1.1. Medio base YMA (*Yeast Morphology Agar*)

Los componentes del medio de cultivo son:

Glucosa anhidra .....	10,0 g
Proteosa peptona No. 3 (Difco) .....	5,0 g
Extracto de levadura (Difco) .....	3,0 g
Extracto de malta (Difco) .....	3,0 g
Agar .....	20,0 g
Agua destilada .....	1.000 ml

Este medio se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

#### 3.3.1.2. Medio de mantenimiento para mutantes de delección

El medio presenta los mismos componentes que el medio base YMA, incorporando:

G418 (geneticina; Gibco) .....	0,2 g
Glicerol .....	150 ml
Agua destilada .....	Enrasar hasta 1.000 ml

La esterilización se realizó en autoclave a 121 °C durante 20 minutos. La geneticina se incorporó tras el proceso de esterilización.

### 3.3.2. Medios de detección de actividad *killer*

#### 3.3.2.1. Medio base YMAMB (*YMA-Methylene Blue*)

El medio YMAMB contiene los mismos componentes que el medio base YMA, añadiendo:

Ácido cítrico .....	6,0 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12 H <sub>2</sub> O .....	16,1 g
Solución de azul de metileno 1,5% (p/v) .....	0,5 ml
Agua destilada .....	1.000 ml

El medio se esterilizó a 121 °C durante 20 minutos, con un pH final 4,0 (Santos *et al.*, 2000).

### 3.3.2.2. Medio de detección de actividad *killer* para los mutantes de delección deficientes en el anclaje GPI

En este caso se utilizó el medio YMAMB con KCl 0,6 M para estabilizar osmóticamente a los mutantes de delección. La esterilización se llevó a cabo en autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

### 3.3.3. Medios para la producción de toxina *killer*

#### 3.3.3.1. YMB tamponado (*Yeast Morphology Broth*)

Este medio de cultivo presenta los mismos componentes que el medio base YMA sin la incorporación de agar y está tamponado con tampón citrato/fosfato a pH 4,0.

Ácido cítrico .....	6,0 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12 H <sub>2</sub> O .....	16,1 g
Agua destilada .....	1.000 ml

El medio se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

#### 3.3.3.2. YNBG (*Yeast Nitrogen Base-Glucose*)

Los componentes del medio de cultivo son:

Glucosa anhidra .....	10,0 g
Yeast Nitrogen Base (Difco) .....	6,7 g
Ácido cítrico .....	6,0 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12 H <sub>2</sub> O .....	16,1 g

La esterilización se realizó por filtración utilizando filtros *Millipore* de 0,22 µm de diámetro de poro. El pH final del medio fue 4,0.

### 3.3.3.3. YNB-D-Brij-58 (YNB-Dextrosa-Brij-58)

El medio presenta los mismos componentes que el YNBG, incorporando Brij-58 al 0,01% (p/v) (Santos *et al*; 2000). El pH final del medio fue 4,0, realizándose la esterilización por filtración (0,22  $\mu$ m).

### 3.3.4. Medio para la regeneración de protoplastos

Este medio de regeneración se preparó añadiendo los siguientes componentes (Santos & Marquina, 2004a):

Glucosa anhidra .....	20,0 g
Proteosa peptona No. 3 (Difco) .....	20,0 g
Extracto de levadura (Difco) .....	10,0 g
KCl .....	44,7 g
Agar .....	12,0 g
Agua destilada .....	1.000 ml

La esterilización se llevó a cabo en autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

### 3.3.5. Medio *Yeast Tryptone Agar* (2xYT) para la obtención de células competentes y transformación

Los componentes del medio de cultivo son:

Triptona (Difco) .....	16,0 g
Extracto de levadura (Difco) .....	10,0 g
NaCl .....	5,0 g
Agar .....	15,0 g
Agua destilada .....	1.000 ml

El medio líquido correspondiente (*Yeast Tryptone Broth*) no lleva agar entre sus componentes. Ambos medios se esterilizaron en autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

### 3.4. Ensayo de actividad *killer* por el método de difusión en placa

La actividad *killer* se determinó utilizando el método descrito por Llorente *et al.* (1997). Muestras de toxina *killer* purificada (30  $\mu$ l) se depositaron en discos de papel estériles (AA Whatman, 6 mm de diámetro) sobre la superficie de placas con medio YMAMB sembradas: una mitad, con la cepa sensible tipo *S. cerevisiae* BY4743, y la otra, con uno de los mutantes de delección seleccionados. La incubación de las placas se realizó a 20 °C durante tres días. Tras ese tiempo, el diámetro de la zona de inhibición se consideró como una medida de la sensibilidad a PMKT (Santos *et al.*, 2005), expresando la actividad de la toxina en Unidades Arbitrarias (UA; Barandica *et al.*, 1999; Santos *et al.*, 2000). Para cada mutante, la medida de la sensibilidad a la toxina se realizó por triplicado, comparando los resultados obtenidos con los de la cepa sensible tipo [(halo de inhibición del mutante) / (halo de inhibición cepa tipo) x 100]. En el caso de los mutantes deficientes en el anclaje GPI se procedió del mismo modo, empleando el medio de detección de actividad *killer* específico (apartado 3.3.2.2) en lugar de YMAMB (Santos *et al.*, 2007).

### 3.5. Producción y purificación de la toxina *killer* PMKT

La cepa *killer*, *P. membranifaciens* CYC 1106, se inoculó en tres matraces de dos litros de capacidad que contenían un litro del medio YNB-D-Brij-58. Dichos matraces se incubaron a 20 °C en agitación (150 rpm) durante tres días. Tras ese tiempo, el medio se centrifugó (4.000 x g, 10 min, 0 °C) para eliminar las células y al sobrenadante obtenido se le añadió glicerol hasta una concentración final del 15% (v/v) para estabilizar la toxina durante el proceso de purificación (Santos & Marquina, 2004b). Posteriormente, el sobrenadante se concentró a un volumen final aproximado de 75 ml mediante ultrafiltración tangencial (Filtron Technology Corporation), utilizando una membrana de 10 kDa de diámetro de poro (*Minisette Membrane Cassette*, Omega Type). La toxina concentrada se filtró a través de filtros (Millipore) de 0,22  $\mu$ m de tamaño de poro (para su esterilización) y se precipitó con etanol frío (-20 °C) hasta una concentración final del 45% (v/v). Después de un periodo de incubación de aproximadamente 30 minutos a 0-4 °C, el precipitado resultante se separó por centrifugación (8.000 x g, 10 min, 0 °C). Las proteínas presentes en el sobrenadante se precipitaron de nuevo con etanol frío (-20 °C) hasta una concentración final del 75% (v/v). Tras la centrifugación (8.000 x g, 10 min, 0 °C), el sedimento resultante se liofilizó y resuspendió en 5 ml de tampón citrato/fosfato 0,1 M a pH 4,0, empleándose posteriormente para la realización de un isoelectroenfoque preparativo en Ultrodex (Pharmacia, Uppsala, Suecia) (Santos & Marquina, 2004a, 2004b). Una vez resuelto, el gel se cortó en bandas de aproximadamente 4 mm y cada una de ellas se depositó en tubos *Eppendorf* estériles. El



contenido en proteínas se extrajo añadiendo 2 ml de agua destilada estéril a cada tubo, separando el gel posteriormente por centrifugación (1.500 x g, 1 min, 4 °C). Después de medir el pH de todos los sobrenadantes, estos se dializaron durante 24 horas en tampón citrato/fosfato 10 mM (pH 3,5) con glicerol al 15% (p/v). Se determinó la actividad *killer* de cada uno de ellos empleando el método descrito en el apartado 3.4.

Todas las fracciones de proteína que mostraron actividad tras ser resueltas en el isoelectroenfoque preparativo (apartado 3.5.1) se agruparon y aplicaron sobre una columna cromatográfica (cromatografía de afinidad) constituida por una matriz de (1→6)-β-D-glucano-epoxi-sepharosa 6B (Schmitt & Radler, 1989; Santos *et al.*, 2002). Las alícuotas eluidas de la columna (1 ml cada una) se ajustaron rápidamente a pH 4,0 (tampón citrato/fosfato 0,5 M) y, tras ser dializadas (como previamente se ha descrito), se utilizaron para llevar a cabo ensayos de actividad *killer* con la cepa sensible (apartado 3.4). Aquellas fracciones de proteína que mostraron actividad se emplearon como toxina purificada en el resto de experimentos, comprobándose el peso molecular descrito en la bibliografía (18 kDa) mediante electroforesis (PAGE-SDS) (Santos & Marquina, 2004b).

### 3.5.1 Isoelectroenfoque preparativo en Ultrodex

Para la realización de los isoelectroenfocos (IEF) preparativos en Ultrodex (Pharmacia) se empleó el dispositivo *Flat Bed Equipment 3000* y el kit para IEF-preparativo (Pharmacia). El gel se preparó con 2,0 g de Ultrodex (Pharmacia), 1,0 ml de anfolitos *Pharmalyte* (Pharmacia; pH 2,5-5,0), 0,5 g de glicina y 49 ml de agua, siguiendo las instrucciones del fabricante. En el cátodo y en el ánodo se colocaron tiras de papel Whatman nº 3 humedecidas con NaOH 1,0 M y H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,5 M, respectivamente. El pre-enfoque se llevó a cabo sin muestra a 800 V durante una hora, siendo la potencia de la corriente aplicada sobre el gel de 8 W y la temperatura del ensayo 4 °C. Tras ese tiempo, 1 ml de extracto de toxina *killer* se aplicó directamente sobre el gel para realizar el enfoque. El proceso transcurrió a 10 W de potencia constante durante 7 horas, correspondiendo a un potencial inicial de 2000 V. Finalmente, la posición concreta de la toxina *killer* en el gel se determinó tras analizar la actividad *killer* como se describe en el apartado 3.5 (Santos & Marquina, 2004b).

### 3.5.2 Cromatografía de afinidad

La cromatografía de afinidad se llevo a cabo siguiendo una modificación del método descrito por Hutchins & Bussey (1983). En primer lugar, se preparó el gel resuspendiendo 2,0 g del soporte cromatográfico, sepharosa 6B epoxi-activada (Sigma), en agua destilada

(alcanzando un volumen aproximado de 6 ml). A continuación, se realizó un lavado del gel durante aproximadamente una hora empleando 200 ml de agua destilada. Posteriormente, para realizar la unión con los (1→6)-β-D-glucanos purificados, el gel se lavó con 20 ml de NaOH 0,1 M (ajustando el pH a 11,5 con carbonato sódico) y se incubó con 40 mg de (1→6)-β-D-glucano disuelto en 15 ml de NaOH 0,1 M (pH 11,5) durante 20 horas a 35 °C en agitación. Después, el gel se lavó sucesivamente con NaOH 0,1 M, agua destilada, tampón borato sódico 0,1 M (pH 8,0; 0,5 M NaCl) y tampón acetato sódico 0,1 M (pH 4,0; 0,5 M NaCl) para su acondicionamiento. Además, se realizó un último lavado del gel con etanolamina 1,0 M a pH 8,0 (en agitación toda la noche) para inactivar los posibles sitios de unión remanentes (grupos oxirano). A continuación, tras aplicar el gel en la columna (1,9 x 3,8 cm) antes de su uso, este se equilibró mediante varios lavados con una solución de glicerol al 15% (v/v) en tampón citrato/fosfato 0,01 M a pH 3,5 (Santos *et al.*, 2002; Santos & Marquina, 2004b). Finalmente, las fracciones de proteína (toxina *killer*) que mostraron actividad tras ser resueltas en el isoelectroenfoque preparativo se dializaron y aplicaron después a la columna de cromatografía, eluyéndose con una solución de glicerol al 15% (v/v) y NaCl 1,5 M en tampón citrato/fosfato 0,01 M (pH 5,0). Las fracciones eluidas se emplearon como se describe en el apartado 3.5.

### 3.5.3 Electroforesis (PAGE-SDS)

Las alícuotas de toxina *killer*, dializadas tras ser eluidas de la cromatografía de afinidad, se utilizaron para realizar electroforesis en condiciones desnaturalizantes según el método descrito por Laemmli (1970). Las muestras aplicadas en geles de poliacrilamida al 12% (BioRad) se corrieron durante una hora (120 V) utilizando el sistema *mini-PROTEAN III* de BioRad (Anexo 1). Tras ese tiempo, la tinción de las proteínas se realizó con una solución de azul Coomassie R-250 (Anexo 1), en agitación durante dos horas, y se destiñeron con una solución decolorante (Anexo 1) hasta la aparición de un fondo claro. La masa molecular de la toxina se determinó comparando su movilidad con la de las proteínas patrón utilizadas: miosina de músculo de ratón (205 kDa), β-galactosidasa de *E. coli* (116 kDa), fosforilasa B (97,4 kDa), ovoalbúmina de pollo (45 kDa), inhibidor de tripsina de soja (20,1 kDa), α-lactoalbúmina (14 kDa), y aprotinina (7 kDa); Sigma.

## 3.6 Cinética de muerte por acción de la toxina *killer* PMKT en la cepa sensible *S. cerevisiae* BY4743

Para determinar la cinética de muerte por acción de la toxina *killer* PMKT se empleó el método utilizado por Santos & Marquina (2004a) con ligeras modificaciones. Células de la

cepa sensible, *S. cerevisiae* BY4743, se incubaron en medio YMB (tamponado pH 4,0). Cuando se alcanzó la fase exponencial de crecimiento (absorbancia a 600 nm = 0,5) las células se recuperaron por centrifugación (13.200 rpm, 2 min, 4 °C). De ellas, 10<sup>5</sup> células se resuspendieron en 1 ml de extracto crudo de la toxina *killer* de *P. membranifaciens* CYC 1106 (1.205 UA/ml). Paralelamente, como control, se utilizó 1 ml de extracto crudo de toxina *killer* inactivada por calor (75 °C durante 10 minutos). La incubación se realizó a 20 °C en agitación durante 8 horas, tomando alícuotas de células a lo largo de ese tiempo. Estas alícuotas se diluyeron convenientemente (banco de diluciones) y se sembraron después en medio YMA. Al cabo de 48 horas a 30 °C se realizó el recuento en placa del número de colonias viables (Santos *et al.*, 2005).

### 3.7 Análisis de la respuesta transcripcional por acción de PMKT y aislamiento de ARN

Células de *S. cerevisiae* BY4743 se incubaron en 100 ml de medio YMB (tamponado a pH 4,0), a 20 °C y en agitación, hasta que se alcanzó la fase exponencial de crecimiento (absorbancia a 600 nm = 0,5). En ese momento, se tomó una alícuota de 10 ml del medio y se recuperaron las células por centrifugación (14.000 rpm, 1 min, 4 °C), congelándose posteriormente en nitrógeno líquido (estas células se utilizaron para determinar los perfiles de expresión en condiciones basales [población control]). Inmediatamente después, el resto del cultivo se expuso a PMKT (1.205 UA/ml), tomando alícuotas de 10 ml de medio a los 0, 15, 30, 45, 60, 90 y 120 minutos de incubación. Las células se recuperaron y congelaron como se ha descrito anteriormente. El ARN total de todas las muestras se extrajo utilizando el método del fenol ácido descrito por Lyne *et al.* (2003).

### 3.8 Hibridación de los *microarrays* de ADN y obtención de datos

Basándonos en los resultados obtenidos en el estudio de la cinética de muerte por acción de PMKT (apartado 3.6), el recuento de colonias viables en placa permitieron determinar el tiempo óptimo de exposición a la toxina en la población celular sensible para la extracción posterior de los ARN empleados en los *microarrays* (inducción de una respuesta génica temprana a la acción de la toxina). De este modo, se llevó a cabo la transcripción inversa (enzima *Superscript*, Invitrogen), por un lado, utilizando 40 µg del ARN total extraído de las células sensibles tras 45 minutos de exposición a la toxina (apartado 3.7), y por otro, 40 µg del ARN total extraído de la población control (apartado 3.7). En este proceso de síntesis de ambos ADNc se utilizaron desoxinucleótidos trifosfato convencionales (dATPs,

dTTPs y dGTPs) y desoxinucleótidos trifosfato marcados con fluoróforos distintos según la población celular: Cy3-dCTPs (fluorescencia verde), en el caso de la población control; y Cy5-dCTPs (fluorescencia roja), en la población tratada. De este modo, el ADNc aislado de cada tipo celular distinto (control o tratado) poseía un marcador fluorescente diferente. A continuación, 40 µl de una solución con ambos ADNc, mezclados en la misma proporción, se hibridaron sobre *microarrays* de ADN que contenían el 100% de los genes conocidos de *S. cerevisiae*. Esta hibridación se realizó a 62 °C durante 12 horas (*Agilent hybridization chamber*, Agilent Technologies, Palo Alto, CA). Transcurrido ese tiempo, los *microarrays* se lavaron utilizando dos tampones distintos: primero, tampón A (0,1% SDS; SSC 0,6X) a 50 °C; y segundo, tampón B (SSC 0,03X) a 20 °C durante 5 minutos. Posteriormente, se realizó un escáner de los *microarrays* (*Agilent scanner G2565BA*, Agilent Technologies) y las imágenes obtenidas (color e intensidad de cada punto en el *array*) se analizaron utilizando el programa *Agilent Feature Extraction*, versión 7.5 (DeRisi *et al.*, 1997; Spellman *et al.*, 1998). Arbitrariamente, se consideró que los genes se expresaban de forma diferencial cuando sus tasas de expresión eran superiores a +3,0 (regulados positivamente: inducción) o inferiores a -2,0 (regulados negativamente: represión) en cuatro *arrays* distintos, utilizando para cada gen el valor promedio de su expresión en los distintos *arrays*. Sólo se utilizaron aquellos genes que mostraron una tasa de expresión constante en los distintos experimentos. Teniendo en cuenta el criterio asumido, muchos de los genes estudiados (aquellos cuyas tasas de expresión se encuentran entre +3,0 y -2,0) presentaron una expresión variable. El origen de esta variabilidad no se conoce, pero podría ser atribuida al hecho de que población de levaduras tratada con la toxina no respondiese de forma sincronizada a la acción de esta. También podría ser debida a pequeñas diferencias en la pureza de la toxina aplicada, la composición del medio de cultivo o la fase de crecimiento de las células sensibles.

### 3.9 PCR cuantitativa en tiempo real (Q-RT-PCR)

Inicialmente, el ARN total extraído de las células sensibles tras 45 minutos de exposición a la toxina (apartado 3.7) se trató con DNasa I (Sigma) libre de RNasa para eliminar los posibles restos de ADN producidos durante la extracción. A continuación, con el ARN obtenido (1 µg) se llevó a cabo un proceso de transcripción inversa empleando el kit *High Capacity cDNA Archive Kit* (Applied Biosystems), donde se utilizó la siguiente mezcla de reacción: ARN (1 µg), tampón RT 10X (2 µl), oligonucleótidos al azar 10X (2 µl), enzima *MultiScribe Reverse Transcriptase* (50 U/µl; 1 µl), mezcla de dNTPs (100 mM; 0,8 µl), inhibidor de ARNasas (39.600 U/ml; 0,2 µl), y agua hasta completar un volumen final de 20 µl. Las etapas de incubación de esta mezcla fueron: 10 minutos a temperatura ambiente,

2 horas a 37 °C y 10 minutos a 65 °C; empleando siempre muestras por duplicado. Este proceso permitió obtener el ADNc, una molécula de ADN monocatenario complementaria al ARN que sirvió de molde en la reacción de Q-RT-PCR.

La reacción de amplificación (Q-RT-PCR) se realizó, por cuadruplicado, en placas de 96 pocillos (Applied Biosystems) empleándose como marcador de detección y cuantificación SYBR® Green (Wittwer *et al.*, 1997). Cada pocillo contenía un volumen total de 40 µl: 25 µl de la Mezcla Maestra SYBR® Green PCR Master Mix (2X; Applied Biosystems), 3 µl de los oligonucleótidos específicos (Anexo 2; Tablas 12 y 13; oligonucleótidos 1 y 2) a una concentración de 300 nM, 4 µl de agua y 8 µl de ADNc.

El diseño de los oligonucleótidos empleados en el experimento se llevó a cabo mediante el uso de los programas *Primer Express* (Applied Biosystems; versión 2.0) y *OligoAnalyzer* (Oligo Analyzer; versión 2.5). Para cada gen, del listado de posibles secuencias proporcionadas por ambos programas, la elección de los oligonucleótidos se hizo fundamentalmente teniendo en cuenta sus sitios de unión al ADNc (Bookout & Mangelsdorf, 2003). Tras la elección, cada una de estas secuencias (Tablas 12 y 13; Anexo 2) se utilizó para llevar a cabo un análisis mediante el programa *Blast* disponible en internet ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) para asegurar su especificidad única, comprobándose también dicha especificidad al determinar un único producto de PCR (amplificación) tras su resolución en geles de agarosa al 1% (apartado 3.10). La síntesis y adquisición de estos oligonucleótidos se realizó por vía comercial a través de Sigma-Genosys (Sigma-Genosys, Ltd).

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador a tiempo real ABI PRISM® 7900 HT (Applied Biosystems, Warrington, UK), empleando un programa que incluía un primer ciclo de desnaturalización (10 minutos a 95 °C) y 39 ciclos posteriores de alineación (95 °C, 10 segundos) y extensión (60 °C, 1 minuto). En cada ensayo, la normalización de los niveles de expresión del gen en estudio (ADNc) se realizó respecto al gen constitutivo *IPP1* (pirofosfatasa inorgánica), cuya expresión no se ve afectada por la presencia de la toxina PMKT (Rep *et al.*, 2000); y se utilizaron dos tipos de controles: controles NTC (*non-template control*), donde el molde de ADNc es sustituido por agua y que permite detectar (por amplificación) elementos contaminantes o dímeros de oligonucleótidos en la mezcla de reacción; y controles RT (-), donde el ADNc se sustituye por ARN para detectar la posible amplificación a partir del ADN genómico no eliminado tras el tratamiento con DNasa I (Sigma) en las muestras de ARN extraídas de las células sensibles.

Para todos los genes en estudio, incluido el gen de expresión constitutiva *IPP1*, se realizaron curvas estándar empleando diluciones decimales. Las curvas se obtuvieron

representando los valores de Ct (Ciclo *threshold*; ciclo de PCR a partir del cuál la señal de fluorescencia detectada es mayor que el nivel mínimo de detección) frente al logaritmo de la cantidad de ADNc molde en cada dilución. En todos los casos, las eficacias de amplificación de los genes en estudio resultaron ser muy similares a las del gen *IPP1* (pendiente cercana a -3,33, que se corresponde con una eficacia del 100%), comprobando además que la diferencia entre la pendiente de este gen constitutivo y la del resto de los genes en estudio era menor de 0,1. Por todo ello, se empleó el método de  $\Delta\Delta C_t$  para realizar la cuantificación relativa de los niveles de expresión en la cepa sensible tras su exposición a PMKT (Livak & Schmittgen, 2001). Para cada uno de los genes, el valor de expresión considerado fue la media en cuatro experimentos independientes.

### 3.10. Electroforesis de ARN en geles de agarosa

La preparación de los geles (agarosa al 1%) se llevó a cabo resuspendiendo 0,4 g de agarosa (Sigma) en 40 ml de tampón TAE 1X (Anexo 1), calentando esta mezcla en microondas (sin hervir) hasta la aparición de una solución completamente transparente. A continuación, tras un primer enfriamiento de la solución a temperatura ambiente, se le añadieron 3  $\mu$ l de bromuro de etidio (EtBr) 25 mM y posteriormente se depositó en un molde específico hasta su gelificación (aproximadamente 30 minutos). Después de incorporar las distintas muestras de ARN en cada uno de los pocillos del gel (1  $\mu$ g de ARN, 3  $\mu$ l tampón de carga -Anexo 1- y 3  $\mu$ l de agua DEPC), la electroforesis se llevó a cabo a 100 V durante una hora utilizando el sistema Sub-Cell GT de BioRad. Transcurrido ese tiempo, la visualización de las bandas obtenidas se realizó empleando luz ultravioleta (UV) de 320 nm (Transiluminador LKB 2011, Pharmacia).

### 3.11 Northern Blot para el análisis de genes cuya expresión se ve condicionada por la presencia de PMKT

Los perfiles de expresión obtenidos mediante el empleo de *microarrays* de ADN (apartado 3.8) fueron confirmados por Q-RT-PCR (apartado 3.9) tras la exposición de las células sensibles a la acción de la toxina PMKT durante 45 minutos. De este modo, aquellos genes cuya variación en la expresión (sobreexpresión) resultó ser muy elevada se seleccionaron para realizar un nuevo estudio basado en *Northern Blotting* (Thomas, 1980; Rep *et al.*, 1999). Los siete genes seleccionados fueron: *GPD1* y *GPP2*, inducidos por estrés osmótico; *CTT1* y *HSP12*, genes de respuesta a estrés general; *PDR12* y *TRK2*, fuertemente inducidos a valores bajos de pH; y *ENA1*, cuya expresión se ve regulada positivamente en presencia de altas concentraciones de NaCl. La cuantificación relativa de

los niveles de expresión génica obtenidos se hizo comparando todas las señales con la del gen *IPP1* (Rep *et al.*, 2000).

De forma similar al proceso descrito en el apartado 3.7, se utilizaron dos cepas distintas de levaduras sensibles (parental tipo BY4743 y *hog1Δ*) para obtener su ARN total tras ser expuestas a la toxina PMKT a lo largo del tiempo (0 -control  $t_0$ -, 15, 30, 45, 60, 90 y 120 minutos). Después, cada una de estas muestras de ARN obtenidas (20-22  $\mu$ l) se disolvieron en SDS 0,1% (agua DEPC) y se añadieron a 70  $\mu$ l de una solución de desnaturalización (Anexo 1). Tras agitar las mezclas (vórtex), centrifugarlas (15.000 rpm; 5 segundos) e incubarlas a 55 °C durante 15 minutos, éstas se resolvieron mediante electroforesis en geles de agarosa utilizando formaldehído 0,6 M (Merck) como agente desnaturalizante (apartado 3.11.6).

La transferencia se llevó a cabo por capilaridad utilizando una membrana de nailon (*Hybond XL*, Amersham Biosciences) de 11 x 11 cm embebida previamente en tampón SSC 10X (Anexo 1) durante 5-10 minutos. La duración del proceso fue de aproximadamente 12 horas, incluyendo el dispositivo de transferencia, desde su parte inferior hasta su parte superior: soporte base - dos capas de papel Whatman (1 mm) húmedo (tampón SSC 10X) - gel - membrana nailon - cinco capas de papel Whatman (3 mm) seco - varias capas de toallitas de papel (hasta 6 cm de altura) - soporte superior - peso; empleando como tampón en el proceso SSC 10X. Posteriormente, tras retirar la membrana del dispositivo y realizar un lavado de la misma empleando SSC 2X, la fijación de los fragmentos de ARN a la membrana se hizo por exposición de ésta a luz UV de 254 nm (Bio-Link BLX) durante 120 segundos.

El proceso de hibridación incluyó dos etapas: prehibridación e hibridación.

### 3.11.1 Prehibridación

La membrana se depositó dentro de un cilindro de vidrio de forma que los fragmentos de ARN previamente transferidos quedasen orientados hacia interior. Posteriormente, se añadieron 10 ml de una solución de prehibridación (Anexo 1) que sirvió para bloquear la membrana y evitar así los procesos de unión inespecífica, incubándose el cilindro a 42 °C durante 4,5 horas.

### 3.11.2 Hibridación

Antes de aplicar la sonda marcada (20  $\mu$ l) a la membrana para permitir su hibridación, esta se hirvió a 100 °C durante cinco minutos y se depositó posteriormente en

hielo durante otros tres minutos para conseguir su completa desnaturalización. Tras sustituir la solución de prehibridación del cilindro (apartado 3.11.1) por otros 10 ml de solución de hibridación (Anexo 1), se añadió la sonda y el proceso de hibridación se llevó a cabo a 65 °C durante toda la noche. Transcurrido ese tiempo, el líquido de hibridación se desechó y el marcaje inespecífico producido entre la sonda y la membrana se eliminó mediante una serie de lavados sucesivos con una solución de lavado (Anexo 1): primero, dos lavados de 10 ml a temperatura ambiente durante 1 minuto; segundo, dos lavados de 10 ml a 42 °C durante media hora; y tercero, un lavado de 10 ml a 42 °C durante 10 minutos. La hibridación específica se detectó posteriormente por exposición directa de la membrana a una película radio-sensible (*Biomax MR*; Kodak, Rochester, N.Y., USA), variando el tiempo de exposición en función de la sonda utilizada en cada caso. Las muestras se normalizaron frente al nivel de expresión detectado en *IPP1*.

El diseño y marcaje de las sondas empleadas en el experimento se realizó de acuerdo a como se describe en los apartados siguientes.

### 3.11.3 Generación de sondas de ADN

Las sondas de ADN se diseñaron utilizando la base de datos que recoge el genoma completo de la levadura *S. cerevisiae* (SGD). Tras realizar un análisis por *Blast* de cada una de las secuencias de interés, se seleccionaron aquellas que, manteniendo la máxima especificidad para el gen en estudio, presentaban regiones de baja homología con otros genes relacionados. Para generar cada una de esas sondas (incluido *IPP1*), se utilizó una pareja de oligonucleótidos específicos (Tabla 5), diseñados con el programa *OligoAnalyzer* (Oligo Analyzer; versión 2.5) y obtenidos por vía comercial (Sigma Genosis), para llevar a cabo la reacción de PCR (Eppendorf Mastercycler; Tabla 6) a partir del ADN cromosómico de la cepa sensible tipo BY4743.

**Tabla 5** Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de sondas de ADN en el proceso de *Northern Blotting*.

Gen	ORF	Oligonucleótido 1 (5' → 3')	Oligonucleótido 2 (3' → 5')
<i>HSP12</i>	YFL014W	CCGGAAGAAAAACATTTCT	GCCGGTTTTGGCACCTTCG
<i>CTT1</i>	YGR088W	CCGTTGGTGGTGAAAGTGGTACAC	GGACACTGTTTCGGCAGTGTATTGG
<i>TRK2</i>	YKR050W	AAACCAAACGACGTGAAGG	GTGTCTCGCTCTTCGGATTC
<i>GPP2</i>	YER062C	CGTCGACGGTACCATTATCA	TTACCATTCAACAGATCGTCCT
<i>PDR12</i>	YPL058C	CGACTGACGAATTCATTGAGAAAG	GCCATTACTCGAGAGTGGGATAG
<i>ENA1</i>	YDR040C	TTATCGCGGTCAATGTGCTC	ATCAAACCTCACGTTGCCCTC
<i>GPD1</i>	YDL022W	TACTATTGCCAAGGTGGTTGCCGAAA	ATGTAAGAGGATAGCAATTGGACACC



**Tabla 6.** Programa de PCR

Ciclos	Nº repeticiones	Tiempo	Temperatura (°C)
Nº 1	1	2 min	95
Nº 2	30	30 s	94
		60 s	55
		60 s	72
Nº 3	1	5 min	72

### 3.11.4 Marcaje de las sondas

El marcaje de las sondas se realizó por un proceso basado en *random priming* utilizando el kit comercial *Oligolabelling Kit* (Amersham Pharmacia Biotech). Cada una de las sondas de ADN obtenidas en el apartado anterior se diluyó en agua DEPC de forma que la concentración final fuese de 25 ng/μl y el volumen máximo de 34 μl. Tras calentar las muestras durante 2-3 minutos a 100 °C (desnaturalización) y enfriarlas posteriormente en hielo durante 2 minutos, los tubos se centrifugaron brevemente y se les añadió: *Reagent Mix* (10 μl; solución acuosa con dCTP, dGTP, dTTP y una mezcla de hexadesoxi-ribonucleótidos al azar), fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli* (1 μl; 5-10 unidades/μl), y dATPs radio-marcados [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]. La reacción se llevó a cabo incubando los tubos a 37 °C durante una hora.

### 3.11.5 Purificación de las sondas marcadas

Transcurrido el tiempo de marcaje (apartado anterior), la reacción se paró añadiendo a cada uno de los tubos 50 μl de SET 0,2X (Anexo 1). A continuación, el contenido de éstos se depositó en unas columnas previamente preparadas que contenían Sephadex G-50 (Anexo 1) y que se equilibraron mediante varios lavados sucesivos con STE 1X (1 ml, un lavado) y SET 0,2X (1 ml, dos lavados; 0,1 ml, último lavado). Tras la centrifugación (2.500 rpm, 10 s), la primera fracción eluida se depositó en un tubo *Eppendorf* y su nivel de radiactividad se midió con un contador Geiger (Morgan, series 900). Posteriormente, a la columna se le añadieron 100 μl de SET 0,2X y se repitió de nuevo el proceso de la centrifugación. Después de depositar esta segunda fracción eluida en otro tubo *Eppendorf*, su nivel de radiactividad se determinó como se ha descrito anteriormente. Se obtuvo una tercera fracción del mismo modo comprobando, mediante el contador Geiger, que la radiactividad sobrante se fue eluyendo en la columna. Finalmente, las tres fracciones eluidas de cada una de las sondas marcadas se mezclaron en un nuevo tubo *Eppendorf*, recuperando un volumen total aproximado de 350 μl.

Las electroforesis de los ARNs empleados en este proceso de *Northern Blotting* se realizaron según se describe en el siguiente apartado.

### 3.11.6. Electroforesis de los ARN empleados en *Northern Blotting*

Los geles se prepararon añadiendo 2,4 g de agarosa (Sigma) a 174 ml de agua milli-Q autoclavada, calentando esta mezcla posteriormente hasta su ebullición. Tras enfriar hasta 60 °C en un baño de agua, se añadieron 20 ml de MOPS 10X (Anexo 1) y 6 ml de formaldehído al 37% (Merck). Después de homogenizar bien, la mezcla se depositó en un molde específico hasta su completa gelificación (aproximadamente 30 minutos). A continuación, el gel se colocó en la cubeta de electroforesis y cada una de las muestras de ARN (20-22 µl), preparadas según se ha descrito en el apartado 3.11, se aplicaron al gel junto a 18 µl de tampón de carga (Anexo 1). El proceso se llevó a cabo a 100 V (242 mA) durante dos horas utilizando el sistema Sub-Cell GT de BioRad, empleando como tampón de electroforesis MOPS 1X con formaldehído al 37% (Anexo 1). Transcurrido ese tiempo, la eliminación del contenido de formaldehído de gel se realizó mediante dos tipos de lavados: uno con agua autoclavada durante 10 minutos y otro con tampón SSC 10X durante 45 minutos (en agitación orbital).

### 3.12. Detección por *Western Blot* de Hog1p y Hog1p fosforilado

La extracción del total de proteínas solubles de la cepa sensible tipo *S. cerevisiae* BY4743 se llevó a cabo tras ser expuesta a la toxina PMKT a lo largo del tiempo (0 -control  $t_0$ -, 5, 10, 15, 30, 45 y 60 minutos; siendo las condiciones de incubación las mismas que se detallan en el apartado 3.7). Para ello, se empleó la metodología descrita por Davenport *et al.* (1995) y Siderius *et al.* (1997). El homogeneizado proteico que se obtuvo (30 µg de proteína total) se resolvió después mediante la realización de electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% (apartado 3.5.3).

Para realizar la transferencia se empleó una membrana de PVDF (fluoruro de polivinildeno; BioRad), de 5,5 x 8,5 cm, previamente hidratada mediante su inmersión en las siguientes soluciones: metanol (10 s), agua milli-Q (3 minutos) y tampón de transferencia (10 minutos; Anexo 1). El proceso se desarrolló a 100 mA durante 3 horas utilizando el sistema *mini-PROTEAN III* de BioRad. El dispositivo de transferencia incluyó, desde su parte inferior hasta su parte superior: soporte base - esponja - dos capas de papel Whatman (3 mm) - gel - membrana PVDF - dos capas de papel Whatman (3 mm) - esponja - soporte superior; empleando un volumen total de tampón de transferencia de aproximadamente

800 ml. Posteriormente, la membrana se retiró del dispositivo y se lavó con agua milli-Q para eliminar los restos de metanol. Para comprobar que el proceso se desarrolló correctamente, se realizó una tinción de la membrana empleando Rojo *Ponceau* (Anexo 1) y una tinción del gel con una solución de azul *Coomassie* (Anexo 1).

La inmunodetección se llevó a cabo tras eliminar los restos de colorante de la membrana con un primer lavado en agua milli-Q y tres lavados posteriores, de 15 minutos de duración cada uno, con TBS-TWEEN 0,1% (Anexo 1). A continuación, para evitar los procesos de unión inespecífica, el bloqueo de la membrana se hizo por inmersión de ésta en TBS-TWEEN 0,1%-LECHE DESNATADA 0,5% (Anexo 1) durante una hora. Posteriormente, se procedió a la incubación con el anticuerpo primario: en el caso de la fosforilación de Hog1p, se utilizó un anticuerpo anti-MAPK p38-dualmente fosforilado (Thr174 y Tyr176) (New England Biolabs, Beverly, MA), y en el caso de Hog1p, un anticuerpo frente al extremo C-terminal de Hog1p (Yc20, número de catálogo sc-6815; Santa Cruz *Biotechnology*, Santa Cruz, CA); añadiendo ambos a una dilución de 1/500 en TBS-TWEEN 0,1%-LECHE DESNATADA 0,5% e incubando durante toda la noche a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo, la membrana se lavó con TBS-TWEEN (1X durante 15 minutos y 3X durante 5 minutos) y se procedió nuevamente a su bloqueo por inmersión en TBS-TWEEN 0,1%-LECHE DESNATADA 0,5%. A continuación, se añadió el anticuerpo secundario (Sigma), conjugado con peroxidasa, a una dilución de 1/5.000 en TBS-TWEEN 0,1%-LECHE DESNATADA 0,5% y se incubó durante aproximadamente 1,5 horas a temperatura ambiente. Tras la incubación, la membrana se lavó nuevamente con TBS-TWEEN como se ha descrito anteriormente y con agua milli-Q (5 lavados). Finalmente, se procedió a la incubación con 4-6 ml del reactivo ECL (Amersham, Uppsala, Sweden) durante 1-2 minutos, visualizando la aparición de bandas por exposición directa de la membrana de PVDF a un film de autorradiografía a distintos tiempos.

### 3.13. Determinación de glicerol

Para determinar las concentraciones extra e intracelulares de glicerol, las levaduras sensibles utilizadas (parental tipo BY4743 y *hog1Δ*) se incubaron durante toda la noche, a 20 °C, en medio YMB (pH 4,0). A continuación, ambos cultivos se diluyeron empleando el mismo medio hasta alcanzar una absorbancia a 600 nm de 0,3 y se dejaron crecer a 20 °C durante otras cuatro horas más. En ese momento las células sensibles se expusieron a la toxina *killer* PMKT (1.205 UA/ml). A tiempos concretos (0, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3 y 4 horas), realizando el ensayo por triplicado, se tomaron muestras de 10 ml de cada uno de los matraces para llevar a cabo la determinación de los niveles intracelulares y extracelulares de

glicerol. El glicerol intracelular se valoró por filtración (*glass microfibre filters*, Whatman GF/C) y posterior calentamiento a 100 °C de los filtros en 1 ml de agua milli-Q estéril durante 10 minutos. De esta forma, el contenido intracelular de glicerol fue liberado al medio exterior y su valoración se realizó empleando el kit comercial *Glycerol Measurement Kit* (Boehringer Mannheim, número de catálogo 148270). Tras su hervido, los filtros se secaron a 80 °C durante 16 horas para calcular el peso seco celular.

En el caso del glicerol extracelular, se centrifugó 1 ml de las muestras de cultivo recogidas en los distintos tiempos (4.000 g, 5 minutos, 4 °C) y la cantidad de glicerol presente en el sobrenadante se valoró como se ha descrito anteriormente.

### 3.14. Preparación de protoplastos

Las células, mutantes de delección o cepa tipo (100 mg peso seco/ml, obtenido concentrando por centrifugación de un cultivo), se resuspendieron en 100 ml de un medio de pretratamiento específico (Anexo 1) y se incubaron a 30 °C durante 30 minutos. A continuación, las células se lavaron con agua destilada y se resuspendieron y trataron con 6 ml de una solución de zimoliasa 5.000 (2 mg/ml) en KCl 0,6 M a 30 °C. Los protoplastos obtenidos se centrifugaron (800 x g, 2 min) y se resuspendieron en una solución compuesta por CaCl<sub>2</sub> 50 mM y KCl 0,6 M (pH 4,5) en presencia o ausencia de la toxina PMKT.

Para determinar la sensibilidad de los protoplastos (cepa tipo y mutantes de delección) a la acción de la toxina, estos fueron incubados en ausencia o presencia de PMKT (1.205 UA/ml) durante 1h a 20 °C y posteriormente plaqueados en el medio de regeneración (apartado 3.3.4). Transcurridas 48-72 h (20 °C), se comparó el nivel de regeneración de los protoplastos de cada una de las cepas mutantes y de la cepa tipo para determinar el grado de sensibilidad.

### 3.15. Ensayos de unión de la toxina a protoplastos y a células completas

Las células o protoplastos (10<sup>6</sup>/ml) de los diferentes mutantes seleccionados se incubaron durante 30 minutos (20 °C) en presencia de la toxina PMKT (1.205 UA/ml). Posteriormente, se centrifugaron (800 x g, 2 min) y se determinó la cantidad de toxina presente en el sobrenadante (toxina libre) mediante el análisis de su actividad en medio YMAMB (apartado 3.4), utilizando la cepa sensible *S. cerevisiae* BY4743. Se comparó la capacidad de unión de la toxina a cada uno de los mutantes (células enteras o protoplastos) con la de la cepa sensible tipo, expresándose esta relación en porcentaje.

### 3.16. Aislamiento de proteínas de membrana plasmática

Se centrifugaron células de la cepa sensible tipo (800 x g, 2 min), crecidas en medio YMB, y el sedimento resultante (1 g) se resuspendió en 10 ml de un tampón de aislamiento específico (Anexo 1) al que se añadieron los siguientes inhibidores de proteasas: 1mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), 10 µg/ml de leupeptina, 10 µg/ml de pepstatina y 10 µg/ml de quimotripsina. Posteriormente, estas células se mezclaron con un volumen igual de bolas de vidrio (diámetro 0,5 mm) para conseguir su ruptura tras 8 ciclos (1 min/ciclo) de tratamiento con el sistema *Glass Bead Beater* (Biospec Products, Bartlesville, OK, USA). La refrigeración del sistema se realizó mediante una camisa externa que contenía glicerol al 50% a -20 °C. Los fragmentos de membrana de mayor tamaño y las células sin romper se eliminaron por centrifugación a 10.000 x g durante 10 minutos, mientras que la fracción más ligera se recuperó mediante centrifugación a 100.000 x g durante una hora. El sedimento resultante se resuspendió en un tampón específico (Anexo 1) que contenía los mismos inhibidores de proteasas mencionados anteriormente y se conservó a -80 °C. Para llevar a cabo la extracción y el enriquecimiento selectivo de las proteínas integrales y las proteínas ancladas a los fragmentos membrana obtenidos en este proceso, se empleó el kit comercial *Mem-PER (Eukaryotic Membrane Protein Extraction Kit)*; Pierce Biotechnology, Inc. Rockford, IL, USA) según Panaretou & Piper (2006) siguiendo las instrucciones aportadas por la casa comercial.

### 3.17. Aislamiento de proteínas de pared celular

Se centrifugaron células de la cepa sensible tipo (800 x g, 2 min), crecidas en medio YMB, y el sedimento resultante se lavó tres veces con tampón Tris-HCl 10 mM (pH 7,4) al que previamente se le había añadido PMSF 1,0 mM (Sigma). A continuación, las células se dispusieron en el sistema *Glass Bead Beater* del mismo modo que se ha descrito en el apartado 3.16, consiguiendo su ruptura tras 5 ciclos de tratamiento (1 min/ciclo, con intervalos de 30 segundos) a 0 °C. Las bolas de vidrio se separaron por filtración (filtros de nailon, GE Osmonics Labstore, *GE Nylon Hydrophilic Supported Membrane*, diámetro 20 µm) mientras que los fragmentos de pared celular se recuperaron por centrifugación (3000 x g, 10 min).

Para solubilizar las proteínas de pared celular unidas a ésta de forma no covalente y eliminar posibles restos del citosol y de la membrana plasmática aún presentes tras el proceso de extracción, los fragmentos de pared celular aislados se lavaron varias veces con NaCl 1,0 M y se hirvieron dos veces (2 min) en presencia de SDS, EDTA y β-mercaptoetanol

(Anexo 1). Después de este tratamiento, los fragmentos de pared se sometieron a dos procesos de digestión enzimática consecutivos que facilitaron la extracción selectiva de ciertos tipos de proteínas: en primer lugar, se incubaron dos veces con una enzima recombinante endo- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-glucanasa procedente de *Trichoderma harzianum* (0,7 U/g de pared celular) para aislar las proteínas de pared ancladas a ésta mediante GPI (Kapteyn *et al.*, 1996), deteniendo cada uno de estos procesos de digestión por la adición de SDS 0,4% y el calentamiento de la muestra a 100 °C durante 2 minutos. En segundo lugar, después del tratamiento con endo- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-glucanasa, los fragmentos de pared celular se incubaron con *Quantazyme* (Quantum Biotechnologies, Montreal, Canada), una enzima recombinante  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-glucanasa que sirvió para liberar proteínas Pir con gran abundancia en Cwp1p (Kapteyn *et al.*, 2001). Todas las fracciones de proteínas obtenidas fueron agrupadas, dializadas y posteriormente utilizadas para llevar a cabo cromatografía de afinidad.

### 3.18. Purificación del receptor secundario (Cwp2p) por cromatografía de afinidad

La preparación de la cromatografía de afinidad se realizó del mismo modo que se ha descrito en el apartado 3.5.2, equilibrando el gel antes de su uso mediante varios lavados con una solución de glicerol al 15% (v/v) en tampón citrato/fosfato 0,01 M a pH 4,5. Para llevar a cabo la unión del receptor secundario a la toxina PMKT, se dializaron muestras de proteínas aisladas de la membrana plasmática o la pared celular (apartados 3.16 o 3.17, respectivamente) durante 24 horas frente a la misma solución tampón que se empleó para equilibrar el gel. Transcurrido el tiempo de diálisis, la toxina PMKT y las muestras de proteínas se cargaron en la columna de forma secuencial: primero la toxina PMKT y luego las proteínas de membrana o proteínas de pared. Tanto el proceso de carga de las muestras en la columna como el lavado de la misma se realizó utilizando la solución tampón mencionada anteriormente, empleando una solución de glicerol al 15% (v/v) y NaCl 1.5 M en tampón citrato/fosfato 0,01 M a pH 5,0 en el proceso posterior de co-elución. Las fracciones recogidas (0,5 ml cada una) se dializaron, se concentraron y se utilizaron para ensayar su actividad *killer* frente a la cepa sensible tipo por el método de difusión en placa tal y como se ha descrito en el apartado 3.4. Las fracciones que mostraron actividad se analizaron por PAGE-SDS en gradiente (gel concentrador: 4%; gel separador: 10-20%; BioRad, *Ready Gel Tris-Tricine Gels*, número de catálogo 161-1108), empleando como tampón del proceso Tris-Tricina (Anexo 1).

Se realizó un control en paralelo, sin PMKT unida a las columnas, para corroborar la especificidad de unión del receptor a la matriz de sepharosa-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucanos sólo en

presencia de la toxina. Las fracciones eluidas de este control se analizaron del mismo modo que se ha descrito anteriormente.

### 3.19. Secuenciación del extremo amino terminal del receptor secundario

Para confirmar la naturaleza de la proteína co-eluida junto a la toxina PMKT en la cromatografía de afinidad, se llevó a cabo el análisis de la secuencia aminoacídica del extremo N-terminal por el método de degradación automatizada de Edman (Edman, 1949; Edman & Begg, 1967) a partir de las bandas obtenidas previamente mediante transferencia a una membrana de PVDF (*Western Blotting*, apartado 3.12).

### 3.20. Espectrometría de masas MALDI-TOF-MS para el análisis del receptor secundario

Se llevó a cabo el estudio de espectrometría de masas MALDI-TOF-MS (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry*) empleando muestras del receptor Cwp2p y la toxina PMKT eluidas mediante cromatografía de afinidad y también extraídas (por elución en agua) de secciones de gel tras realizar las PAGE-SDS en gradiente (apartado 3.18). Después de su purificación, estas muestras se liofilizaron y se resuspendieron en una solución de TFA (trifluoroacético) al 1% (v/v). La preparación de la matriz en suspensión y su acondicionamiento se realizó mediante el método denominado *dried-droplet*, mezclando 0,5 µl de la solución de preparación de la matriz (Anexo 1) con un volumen igual de la muestra. La mezcla obtenida se depositó sobre el compartimento específico de carga de muestra del espectrómetro MALDI-TOF y se dejó a temperatura ambiente durante unos pocos minutos para su secado y cristalización.

El proceso se llevó a cabo empleando un espectrómetro Autoflex TOF (Bruker-Daltonics, Bremen, DE) equipado con un laser pulsado de nitrógeno de 337 nm. Se realizaron un total de 250 barridos del láser sobre la matriz de forma que los espectros de masas de las muestras ofreciesen la mejor respuesta de señal/ruido. Todos los espectros se obtuvieron usando un voltaje de aceleración de 25 kV y una ganancia del 80%. Para la calibración del equipo se empleó una mezcla de proteínas adquiridas comercialmente (*Protein Calibration Standard II*; Bruker-Daltonics).

### 3.21. Construcción de la proteína de fusión GFP-Cwp2p

Las etapas para la construcción de GFP-Cwp2p se describen a continuación.

### 3.21.1. Descripción general del procedimiento

Para confirmar el posible papel de Cwp2p como receptor de la toxina PMKT, se llevó a cabo la construcción de una proteína de fusión GFP-Cwp2p que posteriormente fue purificada a partir de un extracto de proteínas aisladas de pared celular mediante cromatografía de afinidad con sepharosa 6B epoxi-activada como soporte (apartado 3.5.2). El uso de esta proteína de fusión permitió confirmar la presencia y determinar la localización de Cwp2p en las células sensibles durante la actividad de la toxina, así como comprobar su incorporación en los liposomas que se utilizaron en estudios posteriores (apartado 3.23). La construcción de la proteína GFP-Cwp2p se realizó en dos etapas siguiendo las indicaciones de Ram *et al.* (1998). Durante la primera etapa, se insertó un epítipo del gen *c-myc* tras la secuencia del aminoácido 21 de la proteína Cwp2p mediante el método de extensión por solapamiento (*Overlap Extension*; Higuchi *et al.*, 1988), que consiste en amplificar de forma independiente dos segmentos solapantes de un determinado gen y luego unirlos en una segunda reacción. La primera amplificación por PCR se realizó del mismo modo que se ha descrito en el apartado 3.11.3, empleando la siguiente mezcla de reacción: 1 µl (1 µg/1 µl) de ADN molde Cwp2p; 5 µl (20 mM) de oligonucleótidos 5'-3' y 3'-5' (Cwp2P1 y Cwp2P3 por un lado y Cwp2P2 y Cwp2P4 por otro; Tabla 7); 4 µl (125 mM) de dNTPs; 5 µl de tampón PCR 10X (Promega); 0,5 µl de polimerasa Taq (Promega); y 29,5 µl de agua milli-Q. Los cuatro oligonucleótidos empleados se diseñaron para amplificar la región que incluía 650 pb *upstream* y 550 pb *downstream* del sitio de inserción. La visualización de los productos amplificados se realizó tras correr un gel de agarosa al 1% empleando luz UV de 320 nm (apartado 3.10). Las dos bandas de interés se cortaron del gel y cada una de ellas se resuspendió en 50 µl de agua milli-Q. Posteriormente, 0,5 µl de los productos seleccionados anteriormente se emplearon como ADN molde en una segunda reacción de PCR, donde se utilizó el mismo programa y la misma mezcla de reactivos, y los oligonucleótidos Cwp2P1 y Cwp2P2 (Tabla 7). Tras la amplificación, el producto de PCR resultante se corrió en un gel de agarosa 1% y se purificó la banda de interés. El fragmento *c-myc-CWP2* se sometió a un proceso de digestión enzimática (*Sal1* y *Kpn1*; apartado 3.21.5) para permitir su inserción en el plásmido multicopia YEplac195 (aislado de la cepa *Escherichia coli* ATCC 87589), obteniéndose así el plásmido pAR203.

En la segunda etapa, la secuencia codificante del epítipo *c-myc* fue eliminada de pAR203 por digestión enzimática (*Sal1* y *Kpn1*; apartado 3.21.5) y sustituida por el ADN de GFP (*Green Fluorescent Protein*) de *Aequorea victoria* (tratamiento previo con *Kpn1* y *Xho1*; apartado 3.21.5) hasta la obtención del plásmido pAR205. Finalmente, se llevó a cabo el análisis de la secuencia de ADN resultante para corroborar la efectividad del proceso de fusión.



**Tabla 7.** Oligonucleótidos empleados en la primera reacción de PCR para la inserción del epítipo de *c-myc* tras el aminoácido 21 de Cwp2p por el método de extensión por solapamiento.

Oligonucleótido	Tamaño (pb)	Secuencia
Cwp2P1 (5' → 3')	28	5'-AACTGCAGCGGACATCTGGAAAGTTACG-3'
Cwp2P2 (3' → 5')	28	5'-GCTCTAGACTTGTATTCTCCTATCAGCC-3'
Cwp2P3 (3' → 5')	60	5'-ATTCAAGTCCTCCTCGGAAATCAACTTTTGCTCGTCGACATCGGCAATGACCATCTTAGC-3'
Cwp2P4 (5' → 3')	60	5'-GAGCAAAAGTTGATTTCGAGGAGGACTTGAATGTCGACTCCGAAGAATTCGGCCTGGTG-3'

En rojo se muestra la diana para la enzima de restricción *Pst*1, en azul la diana para *Xba*1 y en verde la diana para *Sal*1. Subrayada se muestra la secuencia del epítipo *c-myc*.

### 3.21.2 Obtención de células competentes

Para la obtención de células competentes se utilizó el método descrito por Dagert & Ehrlich (1979). Se añadió un inóculo de *E. coli* JM109 (*recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi*, *hsdR17*, *supE44*, *relA1*,  $\Delta(lac-proAB)/F'$ ) [*traD36*, *proAB*<sup>+</sup>, *lacI*<sup>f</sup>, *lacZ* $\Delta$ M15] (Takara, ref. 9052. *E. coli* JM109 *Competent Cells*) a 5 ml de medio 2xYT (apartado 3.3.5) y se dejó crecer durante toda la noche a 37 °C en agitación. A continuación, se realizó una dilución 1/100 de este cultivo empleando el medio citado anteriormente, siendo el volumen final de la dilución 25 ml. Tras incubar de nuevo durante 90-180 minutos, permitiendo así al microorganismo alcanzar la fase de crecimiento exponencial (absorbancia a 600 nm = 0,2-0,4), las células se recuperaron por centrifugación a 4 °C (5.000 rpm). El sobrenadante se desechó y las células se resuspendieron en 12,5 ml de una solución fría de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M estéril (Anexo 1), permaneciendo la mezcla en hielo durante las siguientes 2 horas. Posteriormente, las células se recuperaron de nuevo por centrifugación (5.000 rpm, 4 °C) y el sedimento se resuspendió en 2,5 ml de la solución fría de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M estéril. Finalmente, a esta suspensión se le añadió glicerol estéril (Merck) hasta una concentración del 10% (v/v) y, tras permanecer la mezcla en hielo durante 30 minutos, se conservó a -80 °C.

### 3.21.3 Transformación, selección de transformantes y clonación en *E. coli*

La transformación en *E. coli* JM109 se realizó mezclando 100 µl de la suspensión de células competentes preparada en el apartado anterior con 1-10 ng del plásmido pAR205, manteniéndose esta mezcla en hielo un tiempo aproximado de 30 minutos. Después de la incubación, la preparación se sometió a un choque térmico (42 °C) durante 90-120 s y se añadieron 900 µl de medio 2xYT líquido (apartado 3.3.5) para permitir la expresión del vector en las células durante 30-60 min. La selección de transformantes se llevó a cabo por plaqueo, depositando 100 µl de la suspensión anterior y 40 µl de X-gal (5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil- $\alpha$ -D-Galactopiranosido; Sigma B4252) en una placa petri vacía (90 mm) a la que se

añadieron 20 ml de medio 2xYT con agar (apartado 3.3.5) y con carbenicilina (300 mg/l; Anexo 1). Tras la solidificación del medio, las placas se incubaron a 37 °C durante 18 horas. De las colonias seleccionadas (blancas) se obtuvo un cultivo puro por resiembra en 2xYT.

#### 3.21.4 Purificación del plásmido por MINIPREP

La recuperación del plásmido clonado se realizó por MINIPREP, que se basa en el proceso de lisis alcalina descrito por Birnboim & Doly (1979). Para ello, una alícuota (1 ml) de un cultivo de las células transformadas de *E.coli* crecido durante 18 horas (37 °C) se centrifugó (14.000 rpm, 1 min, 4 °C) y al sedimento obtenido se le añadieron 150 µl de solución TELT (Anexo 1). Tras resuspender con vórtex, a la solución se le añadió una mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y se agitó. A continuación, se realizó una nueva centrifugación (14.000 rpm, 3 min, 4 °C) y la fase superior recuperada se depositó en un tubo *Eppendorf* limpio. Después de añadir al tubo 400 µl de EtOH 100%, éste se centrifugó (14.000 rpm, 15 min, 0 °C) y el sedimento obtenido se lavó con 0,5 ml de EtOH 70% a -20 °C. Los plásmidos se resuspendieron en 20 µl de agua milli-Q.

#### 3.21.5 Incubación con enzimas de restricción

En todos los casos mencionados anteriormente, la mezcla de reacción se preparó de la siguiente manera: 33 µl de solución 10X, 15 µl de enzima de restricción específica y 216 µl de agua milli-Q estéril; mientras que la reacción se llevó a cabo mezclando 12 µl de la mezcla de reacción y 30 µl de la suspensión de plásmido (MINIPREP) e incubando por exceso una hora a 37 °C. Dependiendo del caso, se utilizaron:

- Enzima *Sa1* y solución 10X tampón O (Fermentas).
- Enzima *Pst1* y solución 10X tampón *Fast Digest* (Fermentas).
- Enzima *Xba1* y solución 10X tampón *Fast Digest* (Fermentas).
- Enzima *EcoR1* y solución 10X tampón *Fast Digest* (Fermentas).
- Enzima *Xho1* y solución 10X tampón R (Fermentas).
- Enzima *Kpn1* y solución 10X tampón *Kpn1* (Fermentas).

#### 3.21.6 Transformación en levaduras sensibles a PMKT

Para llevar a cabo la transformación en la cepa sensible *S. cerevisiae* BY4743 se utilizó el método descrito por Gietz & Woods (2002). Un tubo con 10 ml de medio YMB se inoculó con la levadura y se incubó a 30 °C durante 18 h en agitación (200 rpm). A continuación, el tubo se calentó en agua hirviendo (5 min) y se dejó enfriar en hielo. Tras

centrifugar (14.000 rpm, 1 min, 4 °C) y resuspender el sedimento en agua estéril, una alícuota de 1 ml que contenía aproximadamente  $5 \times 10^8$  células (células/ml) se transfirió a un tubo *Eppendorf* y éste se centrifugó (14.000 rpm, 30 s, 4 °C) para posteriormente descartar el sobrenadante. La mezcla de transformación se añadió al sedimento, componente a componente, en el siguiente orden: 240 µl de PEG 3.500 (polietilenglicol; Merck) al 50% (p/v); 36 µl de acetato de litio 1,0 M (Merck); 50 µl de ADNcs (ADN de esperma de salmón preparado a una concentración de 2 mg/ml según el Anexo 1); y 34 µl de ADN plasmídico (0,1-1,0 µg) en agua milli-Q. La incubación se realizó a 42 °C durante 40-60 minutos, momento tras el cual la mezcla de transformación se eliminó por centrifugación (14.000 rpm, 30 s, 4 °C) y las células presentes en el fondo del tubo se resuspendieron en 1 ml de agua estéril. Finalmente, se pipetearon muestras de 10 y 100 µl en placas con el medio 2xYT de selección de transformantes y estas se incubaron a 30 °C durante 3-4 días. Se obtuvieron rendimientos de  $10^5$ - $10^6$  células transformadas/ml.

### 3.22. Microscopía de fluorescencia

El estudio de microscopía de fluorescencia tuvo una doble finalidad. En primer lugar, observar la localización de la proteína de fusión GFP-Cwp2p en células sensibles completas o tras su incorporación a liposomas (apartado 3.23), siendo el tratamiento previo de ambas muestras un lavado con tampón fosfato salino PBS (Anexo 1) y la posterior incubación a 4 °C durante al menos 15 minutos. Y en segundo lugar, realizar un estudio de sensibilidad a PMKT mediante la determinación del porcentaje de células teñidas con ioduro de propidio (5 µl/ml) (Molecular Probes) tras el tratamiento con la toxina. El equipo empleado fue un microscopio Leica DMRB que incorporaba una cámara *Roper Scientific Cool Snap ES* y el sistema informático *Object Image PTI ImageMaster* (versión 5.0).

### 3.23. Preparación de liposomas cargados con carboxifluoresceína e incorporación de Cwp2p

Para la obtención de los liposomas se utilizaron dos compuestos lipídicos adquiridos vía comercial, 1-palmitoil 2-oleoilfosfatidilcolina y 1-palmitoil 2-oleoilfosfatidilglicerol (Avanti Polar Lipids), que se prepararon como dos soluciones independientes en cloroformo a una concentración de 10 mg/ml. Así, 1 ml de cada una de estas soluciones se mezcló en un vial de cristal de 10 ml de capacidad para posteriormente dejar secar la mezcla resultante en las paredes de éste hasta su evaporación total. Tras eliminar el cloroformo residual mediante un sistema de vacío (30 minutos), se añadieron al vial 2 ml de una solución salina (100 mM

KCl, 20 mM Mes, 100 mM carboxifluoresceína; pH 4,5) y éste se cerró bajo una atmósfera de nitrógeno. La hidratación de los lípidos se realizó a 0 °C durante 30 minutos, momento tras el cual la mezcla lípidos/agua (concentración lipídica = 10 mg/ml) se sonicó (4 °C) hasta observar su aclaramiento. La solución liposomal resultante se sometió a un proceso de congelación rápida en isopropanol/hielo seco (-80 °C; 20 segundos aproximadamente) y a otro sucesivo de descongelación lenta a temperatura ambiente (20-30 minutos), repitiendo esta secuencia experimental (congelación/descongelación) un total de tres veces hasta la obtención de liposomas correctamente constituidos con la carboxifluoresceína encapsulada en su interior.

La proteína de fusión GFP-Cwp2p (apartado 3.21) se incorporó a los liposomas siguiendo el procedimiento descrito por Rigaud *et al.* (1995). De este modo, 250 µl de tampón Tris 5 mM, pH 7,5 / octil glucósido al 1% (Boehringer), que contenía 42,5 µg de GFP-Cwp2p, se añadieron a 500 µl de la solución salina con los liposomas preparada anteriormente. Como control negativo se empleó la misma mezcla de soluciones sin añadir la proteína de fusión GFP-Cwp2p. Posteriormente, se añadió una alícuota de 250 µl de una solución stock de octil glucósido al 2,2% en HEPES 5,0 mM y KCl 100 mM, pH 7,5, a ambas muestras (proteína de fusión y control negativo) de forma que la concentración final de octil glucósido fuese del 0,8%. Las muestras se dializaron toda la noche frente a una solución de KCl 100 mM y Mes 20 mM, pH 4,5. Finalmente, los liposomas se pasaron a través de una columna de Sephacryl S-300 de 18 ml (Amersham Biosciences) para eliminar la proteína de fusión no incorporada.

### **3.23.1 Actividad de la toxina sobre liposomas mediante la determinación de la salida de carboxifluoresceína**

La liberación de la carboxifluoresceína al medio externo tras la aplicación de la toxina PMKT sobre los liposomas se determinó espectrofluorimétricamente a lo largo del tiempo. Las longitudes de onda de excitación y de emisión fueron de 490 nm y 520 nm, respectivamente, utilizando un ancho de banda de 0,4 nm para ambos monocromadores. El control a tiempo cero se realizó añadiendo pequeñas alícuotas de la preparación con los liposomas (21,5 nmol de lípidos cada una) a 3 ml de una solución compuesta por Mes 20 mM y KCl 100 mM, pH 4,5. Posteriormente, la toxina PMKT (1.205 UA/ml) se añadió transcurridos sesenta segundos. La cantidad total de carboxifluoresceína encapsulada en el interior de los liposomas se determinó incorporando a la mezcla anterior Triton X-100 hasta una concentración del 0,1% (p/v) al final de cada ensayo. Como control negativo el

experimento se repitió del mismo modo que se ha descrito pero utilizando toxina PMKT inactivada. Todos los ensayos se llevaron a cabo a 20 °C.

### 3.24 Tratamientos con fosfolipasa C específica de fosfatidil inositol

Una suspensión (500 µl) de  $10^7$  protoplastos/ml de células sensibles de *S. cerevisiae* BY4743 y otra igual del mutante *cwp2Δ* se incubaron, durante 2 horas a 37 °C, en presencia de 200 mU de la enzima PI-PLC (fosfolipasa C específica de fosfatidil inositol; Boehringer Mannheim) en una solución tampón compuesta por  $\text{CaCl}_2$  50 mM y KCl 0,6 M (pH 7,0). El control negativo se realizó del mismo modo sin añadir la enzima. Tras la incubación, las células se recuperaron por centrifugación (800 rpm, 2 min) y posteriormente se resuspendieron en la misma solución tampón (500 µl) empleada anteriormente ajustada a pH 4,5 en presencia de toxina PMKT activa o inactiva. Se tomaron alícuotas (100 µl) a distintos intervalos de tiempo (0, 1, 2, 3 y 5 h) para determinar el porcentaje de regeneración de los protoplastos según lo descrito en el apartado 3.14.

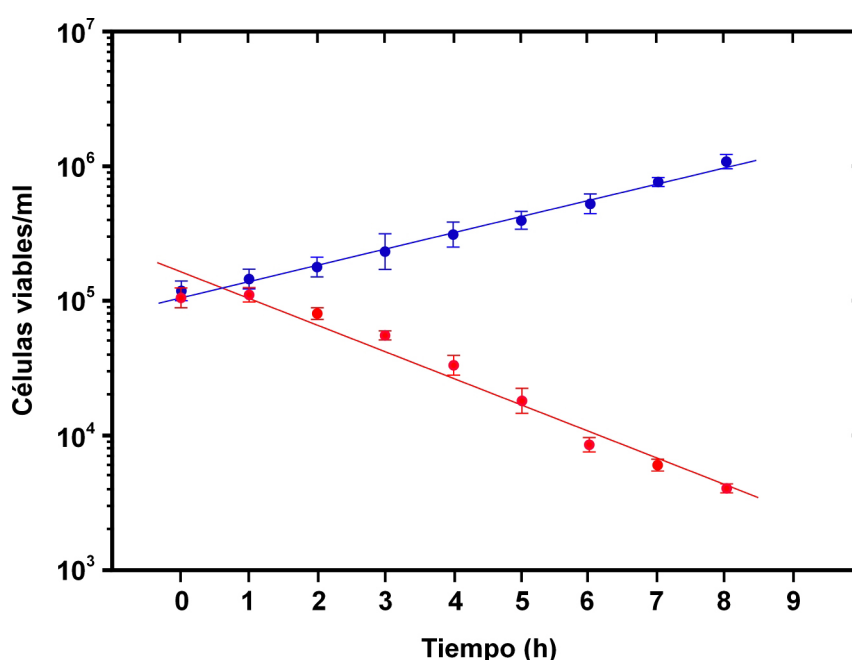
### 3.25 Mutantes deficientes en el anclaje a las moléculas de GPI

Para demostrar que la actividad de PMKT está mediada por proteínas con anclaje a la membrana plasmática de tipo GPI, mutantes específicos o relacionados con la biosíntesis de este sistema de anclaje (*LAS21*, *GWT1*, *GPI8*, *GPI10*, *GPI13*, *GPI14*, *GPI16* y *GPI19*), células enteras y protoplastos (Tabla 11), se expusieron a la toxina *killer* para posteriormente llevar a cabo estudios de sensibilidad y unión a la misma (apartados 3.4 y 3.15, respectivamente). Teniendo en cuenta las características fenotípicas de estos mutantes defectivos (Sobering *et al.*, 2004), el medio empleado fue YMAMB modificado (apartado 3.3.2.2) para hacer permisivas sus condiciones de crecimiento (presencia de un estabilizador osmótico e incubación a 20 °C) (Leidich *et al.*, 1995; Benghezal *et al.*, 1996; Leidich & Orlean, 1996; Benachour *et al.*, 1999; Taron *et al.*, 2000; Fraering *et al.*, 2001; Yan *et al.*, 2001; Davydenko *et al.*, 2005; Newman *et al.*, 2005; Okamoto *et al.*, 2006).

## ***4 RESULTADOS***

#### 4.1. Cinética de muerte de la levadura sensible por acción de la toxina PMKT

Con las condiciones descritas en el apartado 3.6 del capítulo de material y métodos se calculó la tasa de muerte ( $k$ ) para la cepa sensible *Saccharomyces cerevisiae* BY4743 por acción de PMKT, que resultó ser de  $0,22 \text{ h}^{-1}$ . El tratamiento con la toxina produjo una reducción en el número de células viables de una unidad logarítmica tras 8 horas de ensayo. Durante la primera hora de exposición a PMKT no se observó disminución en el número de células viables, existiendo por tanto una fase de latencia previa a la aparición de muerte celular. La tasa de crecimiento ( $\mu$ ) de la población celular control (con toxina inactivada por calor) fue de  $0,12 \text{ h}^{-1}$  (Figura 10).



**Figura 10.** Cinética de muerte de la levadura sensible *S. cerevisiae* BY4743 en presencia de la toxina *killer* PMKT. Para cada valor de tiempo se muestra el promedio del número de células viables (población control -●- y población tratada con toxina *killer* activa -●-) obtenido en tres experimentos independientes y su error estándar asociado. El eje de ordenadas está a escala logarítmica.

#### 4.2 Análisis de los perfiles de expresión génica en la cepa *S. cerevisiae* BY4743 tras su exposición a PMKT basados en *microarrays* de ADN y Q-RT-PCR

Teniendo en cuenta los resultados del apartado anterior, se obtuvieron los ADNc necesarios para la realización de los *microarrays* y las Q-RT-PCRs a partir de los ARNs extraídos de células no tratadas con PMKT (población control a tiempo 0) y de células expuestas a la toxina (1.205 UA/ml) durante 45 minutos (población tratada).

Se estudiaron los perfiles de expresión génica de respuesta a la toxina utilizando *microarrays* de ADN para el 100% de los genes conocidos en *S. cerevisiae*. Aunque una gran parte de las limitaciones inherentes a esta técnica en la cuantificación de los niveles de expresión pudo ser corregida mediante la normalización de los datos, se hizo necesario verificar los resultados más significativos mediante el empleo de Q-RT-PCR. En ambos casos, los niveles de expresión de los ARNm observados tras el tratamiento fueron similares. Los resultados obtenidos mostraron que el nivel de ARNm de un total de 98 genes se incrementó al menos tres veces (regulación positiva: inducción) tras la adición de PMKT (Tabla 8). Asimismo, la expresión de otros 47 genes se redujo (regulación negativa: represión) un mínimo de dos veces tras 45 minutos de exposición a la toxina (Tabla 9). Esta distribución específica de genes proporcionó una amplia información acerca del mecanismo de acción de la toxina *killer* así como de la respuesta que se activa en la célula sensible a nivel molecular.

Según los resultados mostrados en la tabla 8, el grupo funcional de genes inducidos con mayor representación (31 genes) fue el grupo relacionado con la transducción de señales, la expresión génica, la transcripción y el procesamiento de ARN; indicando una importante respuesta celular en presencia de la toxina *killer*. En este grupo, los genes *TSF1*, *NAM8*, *YAP1*, *KKQ8*, *SCH9*, *STE20*, *PBS2*, *MED2*, *SRB4*, *HAL9* y *GAL11* tenían los niveles de expresión más altos. Entre ellos, *YAP1*, *SCH9* y *HAL9* están directamente relacionados con la respuesta a estrés celular y la tolerancia a la sal.

En respuesta a PMKT, se pudo observar la implicación de 19 genes en procesos relacionados con la homeostasis iónica y el transporte facilitado (Tabla 8) (Haro *et al.*, 1991; Mendoza *et al.*, 1996; Nelissen *et al.*, 1997). De todos ellos, destacaron *ENA1/PMR2*, *NHA1*, *IST1*, *TRK2*, *TOK1*, *PSR1*, *PHO84*, *PHO89*, *PHO87*, *ZRT1* y *CTR3*.

Relacionados con la producción de glicerol (Tabla 8), los genes *GPD1* (deshidrogenasas) y *GPP2* (fosfatasas) mostraron los niveles más altos de expresión. Con respecto al metabolismo de la trehalosa, las enzimas codificadas por los ORFs *GLK1*, *PGM2*, *TSL1*, *TPS1* y *NTH1* fueron reguladas positivamente en presencia de PMKT.

Los niveles de expresión de las proteínas de choque térmico (HSPs) se incrementaron significativamente en respuesta a la toxina *killer* (*HSP12*, *HSP104*, *HSP82*, *HSP26*, *DDR2*, *SSA2*, *SSB2* y *SSA1*). Además, se observó una fuerte inducción en la expresión de *CTT1* (catalasa T citosólica), indicando que la célula responde a la acción de la toxina activando mecanismos de respuesta general a estrés (Tabla 8). La toxina también indujo la expresión del gen *YAP1*, que interviene específicamente en la respuesta celular a



estrés oxidativo y que parece ser responsable del rápido establecimiento de una respuesta transcripcional transitoria.

**Tabla 8.** Genes regulados positivamente (tasas de expresión mayores a +3,0) tras la exposición a PMKT. En la tabla se muestra el porcentaje de inhibición de los mutantes defectivos para dichos genes.

Gen	ORF	Descripción del producto génico	Tasa de expresión en <i>microarrays</i>	Tasa de expresión en Q-RT-PCR	Inhibición en mutantes (%)
Transducción de señales, expresión génica, transcripción y procesamiento de ARN (31 genes)					
<i>TFS1</i>	YLR178C	Inhibidor de la carboxipeptidasa Y	15,3	12,5	108
<i>GSP2</i>	YOR185C	Proteína de unión a GTP implicada en el mantenimiento de la organización nuclear, transporte y procesamiento del ARN	5,1	4,3	104
<i>NAM8</i>	YHR086W	Proteína implicada en la recombinación meiótica	10,2	10,1	106
<i>GIP2</i>	YER054C	Subunidad reguladora de la fosfatasa Glc7p tipo I, implicada en el metabolismo de glucógeno	4,3	3,8	105
<i>SDS22</i>	YKL193C	Subunidad reguladora para la función mitótica de la fosfatasa Glc7p tipo I	5,5	4,8	106
<i>YAP1<sup>a</sup></i>	YML007W	Factor de transcripción implicado en halotolerancia y respuesta a estrés oxidativo. Se activa por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y media resistencia a cadmio	12,7	11,6	121
<i>CUP2</i>	YGL166W	Factor de transcripción dependiente de cobre	6,6	7,2	103
<i>XBP1<sup>a</sup></i>	YIL101C	Represor transcripcional inducido por estrés o inanición durante la mitosis	3,8	3,6	CST
<i>REG1</i>	YDR028C	Subunidad reguladora para la fosfatasa Glc7p tipo I	4,1	4,1	102
<i>PAP1</i>	YKR002W	Polimerasa Poli(A) requerida para la formación del extremo 3' del ARNm	4,0	3,9	108
<i>KSP1</i>	YHR082C	Serina/treonina quinasa	5,2	4,3	114
<i>KKQ8</i>	YKL168C	Serina/treonina quinasa de función desconocida	14,1	11,7	109
<i>AKL1</i>	YBR059C	Proteína de la familia de las quinasas Ark; Serina/treonina quinasa implicada en endocitosis y la organización del citoesqueleto	3,5	3,3	110
<i>SCH9<sup>a</sup></i>	YHR205W	Serina/treonina quinasa homóloga de la Akt/PKB de mamíferos. Implicada en la activación transcripcional de genes que intervienen en la respuesta a osmoestrés	10,6	12,5	138
<i>STE20</i>	YHL007C	Quinasa perteneciente a la familia PAK que interviene en la señalización de la ruta de las feromonas	15,9	13,8	114
<i>PSK1<sup>a</sup></i>	YAL017W	PAS quinasa implicada en el control del metabolismo de azúcar y la traducción	8,5	10,1	123
<i>PBS2</i>	YJL128C	MAP quinasa-quinasa que interviene en la transducción de señales de la ruta HOG	19,9	18,5	125
<i>MED2</i>	YDL005C	Mediador en la regulación transcripcional	15,3	14,5	103
<i>ITC1</i>	YGL133W	Subunidad del complejo Isw2p-Itc1p implicado en la reorganización de la cromatina	6,6	8,4	107
<i>SW16</i>	YLR182W	Cofactor de transcripción que interviene en la regulación del ciclo celular	3,3	2,3	103
<i>TIS11</i>	YLR136C	Proteína de unión a ARNm que interviene en la homeostasis de iones hierro	7,1	5,3	CST
<i>UGA3</i>	YDL170W	Activador transcripcional para los genes catabólicos de GABA	3,2	4,3	104
<i>SRB2</i>	YHR041C	Subunidad del complejo ARN polimerasa II	5,3	5,3	CST
<i>SRB4</i>	YER022W	Subunidad del complejo ARN polimerasa II	14,2	17,7	101
<i>GAL11</i>	YOL051W	Subunidad del complejo ARN polimerasa II	12,7	11,5	104
<i>HAL9<sup>a</sup></i>	YOL089C	Activador transcripcional de <i>ENA1</i>	9,2	9,8	124
<i>PRP18</i>	YGR006W	Ribonucleoproteína snRNP U5 que interviene en el procesamiento alternativo ( <i>splicing</i> ) del ARN	8,2	7,7	110
<i>NSR1</i>	YGR159C	Proteína de unión a secuencia de localización nuclear	3,4	3,5	101

Tabla 8. Continuación.

Gen	ORF	Descripción del producto génico	Tasa de expresión en <i>microarrays</i>	Tasa de expresión en Q-RT-PCR	Inhibición en mutantes (%)
<i>CDC40</i>	YDR364C	Factor requerido para el <i>splicing</i> del ARNm	3,1	3,7	109
<i>CBC2</i>	YPL178W	Subunidad pequeña del complejo proteico CBC de unión a ARN	5,5	6,6	103
<i>HEX3</i>	YDL013W	Subunidad del sustrato Slx5-Slx8 específico para el complejo ubiquitina ligasa	4,1	5,5	111
Glicerol, trehalosa y glucógeno (9 genes)					
<i>TPS1</i>	YBR126C	Trehalosa-6-fosfato sintasa (subunidad de 56 kDa); producción de trehalosa	11,4	10,8	104
<i>TSL1</i>	YML100W	Trehalosa-fosfato sintasa (subunidad de 123 kDa); producción de trehalosa	4,8	3,9	106
<i>NTH1</i>	YDR001C	Trehalasa neutra; degradación de trehalosa	3,0	2,9	106
<i>GPP1</i>	YIL053W	Glicerol-3- fosfatasa (isoforma 1); producción de glicerol	5,5	5,2	121
<i>GPP2</i>	YER062C	Glicerol-3- fosfatasa (isoforma 2); producción de glicerol	33,1	40,2	166
<i>GPD1</i>	YDL022W	Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa(NAD); producción de glicerol	41,1	39,7	154
<i>DAK1<sup>a</sup></i>	YML070W	Dihidroxiacetona quinasa, inducida a altas concentraciones de sal	8,2	7,7	121
<i>GLC3</i>	YEL011W	Enzima implicada en la síntesis de glucógeno	3,1	5,0	102
<i>FPS1</i>	YLL043W	Canal de membrana plasmática (familia MIP) para la salida de glicerol. También implicado en la entrada de arsenito y antimonio	16,3	15,8	109
Metabolismo de carbohidratos (12 genes)					
<i>PGM2</i>	YMR105C	Fosfoglucomutasa, isoforma principal	3,9	5,3	101
<i>INO1</i>	YJL153C	Inositol-1-fosfato sintasa	5,3	4,6	103
<i>GLK1</i>	YCL040W	Glucoquinasa específica de aldohexosa/glicolisis	7,7	4,9	109
<i>TKL2</i>	YBR117C	Transketolasa, isoforma 2	5,2	4,7	113
<i>BDH2<sup>a</sup></i>	YAL061W	Gran similitud con la proteína Bdh1p	4,3	4,3	106
<i>HXT1</i>	YHR094C	Proteína de la familia <i>HXT</i> . Transportador de glucosa de baja afinidad	3,5	4,3	CST
<i>HXT11</i>	YOL156W	Proteína de la familia <i>HXT</i> con actividad intrínseca de transporte de hexosa. Se desconoce su función fisiológica	6,9	5,9	102
<i>HXT5</i>	YHR096C	Proteína de la familia <i>HXT</i> . Transportador de glucosa de afinidad moderada	10,1	8,9	133
<i>HXT14</i>	YNL318C	Proteína similar a algunos de los miembros de transportadores de hexosas. Inducido en medios con baja disponibilidad de glucosa	5,8	6,0	112
<i>STL1</i>	YDR536W	Proteína transportadora de glicerol acoplada a H <sup>+</sup> localizada en la membrana plasmática	22,2	19,1	132
<i>GLO1<sup>a</sup></i>	YML004C	Glioxalasa I	9,3	10,0	108
<i>PSK1<sup>a</sup></i>	YAL017W	PAS quinasa implicada en el control del metabolismo de azúcar y la traducción	8,5	10,1	123
Funciones mitocondriales, energía y metabolismo redox (11 genes)					
<i>BDH2<sup>a</sup></i>	YAL061W	Gran similitud con la proteína Bdh1p	4,3	4,3	106
<i>DLD3</i>	YEL071W	D-lactato deshidrogenasa	3,0	3,7	105
<i>ALD5</i>	YER073W	Aldehído deshidrogenasa (NAD), mitocondrial	6,3	7,4	105
<i>ALD4</i>	YOR374W	Aldehído deshidrogenasa (NAD y NADP), mitocondrial	17,9	16,5	116
<i>ALD2</i>	YMR170C	Aldehído deshidrogenasa (NAD y NADP), citosólica	19,3	20,0	111
<i>ALD3</i>	YMR169C	Aldehído deshidrogenasa (NAD y NADP), citosólica	18,4	17,8	112
<i>STF2</i>	YGR008C	Factor estabilizador de la F1F0-ATP sintasa	4,6	4,4	112
<i>MBR1<sup>a</sup></i>	YKL093W	Proteína implicada en funciones mitocondriales y en la respuesta a estrés	5,4	6,2	122

Tabla 8. Continuación.

Gen	ORF	Descripción del producto génico	Tasa de expresión en <i>microarrays</i>	Tasa de expresión en Q-RT-PCR	Inhibición en mutantes (%)
<i>CYB2</i>	YML054C	Citocromo <i>b</i> <sub>2</sub> lactato deshidrogenasa	11,3	11,9	105
<i>CYC7</i>	YEL039C	Citocromo c, isoforma 2	3,1	4,3	104
<i>GRE3</i>	YHR104W	Aldosa reductasa (NADP)	6,6	4,7	101
Metabolismo de aminoácidos (3 genes)					
<i>GCN4</i>	YEL009C	Activador transcripcional de genes implicados en la biosíntesis de aminoácidos	3,4	3,4	104
<i>AVT6</i>	YER119C	Transportador implicado en la salida de aminoácidos del interior de la vacuola	5,1	5,6	CST
<i>ARO9</i>	YHR137W	Aminotransferasa (tipo II) de aminoácidos aromáticos	5,5	7,3	CST
Metabolismo de fosfato (8 genes)					
<i>PHO11</i>	YAR071W	Una de las tres fosfatasas ácidas represibles	8,2	6,9	110
<i>PHO5</i>	YBR093C	Una de las tres fosfatasas ácidas represibles	7,3	9,5	103
<i>PHO86<sup>a</sup></i>	YJL117W	Proteína requerida para la salida del transportador de fosfato inorgánico Pho84p del RE y su correcto empaquetamiento en vesículas	3,9	4,0	103
<i>PHO84<sup>a</sup></i>	YML123C	Permeasa de fosfato inorgánico y manganeso	4,2	4,3	112
<i>PSR1<sup>a</sup></i>	YLL010C	Fosfatasa de membrana plasmática implicada en la respuesta a estrés general	7,9	8,8	127
<i>SDP1<sup>a</sup></i>	YIL113W	Fosfatasa de especificidad dual inducible por estrés	4,9	5,8	117
<i>PHO89<sup>a</sup></i>	YBR296C	Proteína transportadora de fosfato acoplada a Na <sup>+</sup> ; alta afinidad	19,9	20,0	115
<i>PHO87<sup>a</sup></i>	YCR037C	Transportador fosfato de baja afinidad	4,6	3,9	119
Homeostasis iónica y transporte facilitado (19 genes)					
<i>IST1</i>	YNL265C	Proteína implicada en la formación de vesículas junto a Did2p	5,6	4,9	154
<i>NHA1</i>	YLR138W	Intercambiador Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> implicado en la salida de Na <sup>+</sup> y K <sup>+</sup> a través de la membrana plasmática	9,8	8,8	134
<i>TOK1</i>	YJL093C	Transportador de K <sup>+</sup> de membrana plasmática voltaje dependiente	3,3	4,9	108
<i>HAL9<sup>a</sup></i>	YOL089C	Activador transcripcional de ENA1	9,2	9,8	124
<i>ENA1</i>	YDR040C	ATPasa tipo P implicada en la salida de sodio y litio, requerida para la tolerancia de sodio	27,2	30,4	159
<i>TRK2</i>	YKR050W	Componente del sistema de transporte de potasio Trk1p-Trk2p	25,1	22,8	123
<i>PSR1<sup>a</sup></i>	YLL010C	Fosfatasa de membrana plasmática implicada en la respuesta a estrés general	7,9	8,8	127
<i>PHO86<sup>a</sup></i>	YJL117W	Proteína requerida para la salida del transportador de fosfato inorgánico Pho84p del RE y su correcto empaquetamiento en vesículas	3,9	4,0	103
<i>PHO84<sup>a</sup></i>	YML123C	Permeasa de fosfato inorgánico y manganeso	4,2	4,3	112
<i>PHO89<sup>a</sup></i>	YBR296C	Proteína transportadora de fosfato acoplada a Na <sup>+</sup> ; alta afinidad	19,9	20,0	115
<i>PHO87<sup>a</sup></i>	YCR037C	Transportador fosfato de baja afinidad	4,6	3,9	119
<i>GRE1<sup>a</sup></i>	YPL223C	Hidropilina de función desconocida inducida por estrés y regulada por la ruta HOG	6,1	5,7	113
<i>PTK2</i>	YJR059W	Serina/treonina quinasa que interviene en la regulación del transporte iónico a través de la membrana plasmática	8,1	6,4	104
<i>GIT1</i>	YCR098C	Transportador de glicerofosfoinositol, también disponible para mediar transporte de fosfato de baja afinidad	4,6	4,7	105
<i>ZRT1</i>	YGL255W	Proteína transportadora de zinc de alta afinidad	8,9	6,9	109

Tabla 8. Continuación.

Gen	ORF	Descripción del producto génico	Tasa de expresión en <i>microarrays</i>	Tasa de expresión en Q-RT-PCR	Inhibición en mutantes (%)
<i>SIT1</i>	YEL065W	Transportador del sideróforo bacteriano ferrioxamina B. Probablemente sea una proteína de resistencia a múltiples drogas	6,6	6,3	97
<i>PDR12</i>	YPL058C	Transportador ABC de membrana plasmática que actúa como una bomba débil de expulsión de ácidos orgánicos	20,9	20,8	133
<i>PDR5</i>	YOR153W	Proteína de resistencia a drogas pleiotrópicas	4,5	3,7	102
<i>CTR3</i>	YLR411W	Proteína transportadora de cobre	4,1	3,9	106
Estrés celular y rescate (17 genes)					
<i>HSP12</i>	YFL014W	Proteína de choque térmico (HSP; <i>Heat Shock Protein</i> ) localizada en la membrana plasmática que protege frente a desecación	57,8	56,1	141
<i>HSP104</i>	YLL026W	Proteína de choque térmico que coopera con HSP40 y HSP70 en el plegamiento correcto y la reactivación de proteínas previamente desnaturalizadas	8,8	5,9	111
<i>HSP82</i>	YPL240C	Proteína de choque térmico homóloga de la chaperona molecular HSP90. Es requerida para la activación de muchas proteínas implicadas en procesos de señalización celular	4,4	6,0	114
<i>HSP26</i>	YBR072W	HSP pequeña (sHSP) que suprime la formación de agregados de proteínas que poseen un plegamiento incorrecto	13,5	12,4	119
<i>DDR2</i>	YOL052C-A	Proteína de respuesta a alteraciones del ADN ( <i>DNA Damage Responsive</i> ) implicada en la respuesta a distintos tipos de estrés	16,6	13,4	122
<i>SSA2</i>	YLL024C	Proteína de choque térmico de la familia de las HSP70	4,6	5,6	105
<i>SSB2</i>	YNL209W	Proteína de choque térmico de la familia de las HSP70	5,1	4,6	101
<i>SSA1</i>	YAL005C	Proteína de choque térmico de la familia de las HSP70	3,7	4,5	CST
<i>FAP7<sup>a</sup></i>	YDL166C	NTPasa requerida para la síntesis de la subunidad 40S del ribosoma	5,2	6,3	114
<i>WSC4</i>	YHL028W	Relacionado con la integridad de pared del retículo endoplasmático e implicada en la respuesta a estrés	4,9	3,5	102
<i>SCH9<sup>a</sup></i>	YHR205W	Serina/treonina quinasa homóloga de la Akt/PKB de mamíferos. Implicada en la activación transcripcional de genes que intervienen en la respuesta a osmoestrés	10,6	12,5	138
<i>CTT1<sup>a</sup></i>	YGR088W	Catalasa T citosólica. Protección frente a estrés oxidativo por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	37,7	44,2	125
<i>XPB1<sup>a</sup></i>	YIL101C	Represor transcripcional inducido por estrés o inanición durante la mitosis	3,8	3,6	CST
<i>STI1</i>	YOR027W	Cochaperona de la Hsp90 que interacciona con el grupo de proteínas Ssa	5,6	5,7	111
<i>MBR1<sup>a</sup></i>	YKL093W	Proteína implicada en funciones mitocondriales y en la respuesta a estrés	5,4	6,2	122
<i>PSR1<sup>a</sup></i>	YLL010C	Fosfatasa de membrana plasmática implicada en la respuesta a estrés general	7,9	8,8	127
<i>SDP1<sup>a</sup></i>	YIL113W	Fosfatasa de especificidad dual inducida por estrés	4,9	5,8	117
Protección frente a daño oxidativo y químico (8 genes)					
<i>GLO1<sup>a</sup></i>	YML004C	Glioxalasa I	9,3	10,0	108
<i>CTT1<sup>a</sup></i>	YGR088W	Catalasa T citosólica. Protección frente a estrés oxidativo por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	37,7	44,2	125
<i>DAK1<sup>a</sup></i>	YML070W	Dihidroxiacetona quinasa, inducida a altas concentraciones de sal	8,2	7,7	121
<i>GRE2</i>	YOL151W	3-metilbutanal reductasa y metilglioxal reductasa dependiente de NADPH	5,5	5,4	109
<i>MPH1</i>	YIR002C	Protección del genoma frente a daño espontáneo inducido químicamente. Miembro de la familia de helicasas de ARN	6,3	6,9	CST

Tabla 8. Continuación.

Gen	ORF	Descripción del producto génico	Tasa de expresión en <i>microarrays</i>	Tasa de expresión en Q-RT-PCR	Inhibición en mutantes (%)
<i>YAP1<sup>a</sup></i>	YML007W	Factor de transcripción implicado en halotolerancia y respuesta a estrés oxidativo. Se activa por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y media resistencia a cadmio	12,7	11,6	121
<i>FAP7<sup>a</sup></i>	YDL166C	NTPasa requerida para la síntesis de la subunidad 40S del ribosoma	5,2	6,3	114
<i>CSF1</i>	YLR087C	Requerido para el establecimiento de fermentación a bajas temperaturas	6,6	5,7	127
Superficie celular (3 genes)					
<i>SPS100</i>	YHR139C	Proteína requerida en la maduración de la pared de la espora	18,4	18,2	CST
<i>ECM33</i>	YBR078W	Proteína con anclaje tipo GPI de función desconocida	3,3	3,0	119
<i>ALG14</i>	YBR070C	Componente de la UDP-GlcNAc transferasa requerida en la síntesis de oligosacáridos unidos a dolicol	8,8	7,8	121
Genes no caracterizados y proteínas de función desconocida (9 genes)					
<i>HBT1</i>	YDL223C	Sustrato de la proteína Hub1p	7,7	7,6	CST
<i>MSC1</i>	YML128C	Proteína de función desconocida implicada en recombinación meiótica	9,3	9,4	107
<i>PNC1</i>	YGL037C	Nicotinaminidasa	6,8	6,9	102
<i>SFH1</i>	YKL091C	Alta similitud a Sec14p	3,2	3,6	CST
<i>GRE1<sup>a</sup></i>	YPL223C	Hidropilina de función desconocida inducida por estrés y regulada por la ruta HOG	6,1	5,7	113
	YFL015C	Proteína de función desconocida	12,1	10,2	109
	YFR020W	Proteína hipotética. Posible proteína de membrana	5,5	3,7	95
<i>IKI1</i>	YHR187W	Confiere sensibilidad a la toxina <i>killer</i> de <i>K. lactis</i> (Zimocina)	3,5	6,0	121
	YFR026C	Proteína hipotética	4,2	3,3	105

Genes agrupados en categorías funcionales. ABC, *ATP-binding cassette*; CBC, *cap-binding complex*; GABA, ácido  $\gamma$ -aminobutírico; MAP, proteína activada por mitógenos; MIP, proteína principal intrínseca; PAK, quinasa activada por p21; PAS, *Per-ARNT-Sim*; RE, retículo endoplasmático; SRB, supresor de la ARN polimerasa. ORFs<sup>a</sup>, Marcos de lectura abierta incluidos en diferentes categorías. CST, cepa sensible tipo.

**Tabla 9.** Genes regulados negativamente (tasas de expresión inferiores a -2,0) tras la exposición a PMKT. Porcentaje de inhibición de los mutantes defectivos para dichos genes.

Gen	ORF	Descripción del producto génico	Tasa de represión en <i>microarrays</i>	Tasa de represión en Q-RT-PCR	Inhibición en mutantes (%)
Transducción de señales, expresión génica, transcripción y procesamiento de ARN (11 genes)					
<i>RGT1<sup>a</sup></i>	YKL038W	Factor de transcripción que regula la expresión de algunos transportadores tipo <i>HXT</i> en respuesta a glucosa.	19,8	19,1	CST
<i>RDI1</i>	YDL135C	Inhibidor de la disociación de Rho GDP, implicado en la localización y regulación de Cdc42p	3,1	3,0	CST
<i>YVH1</i>	YIR026C	Proteína tirosín fosfatasa	4,2	3,8	CST
<i>MET18</i>	YIL128W	Implicada en NER y en la transcripción de la ARN polimerasa II	4,3	3,9	102
<i>HAP4</i>	YKL109W	Subunidad del factor de unión a CCAAT	3,2	3,5	105
<i>MTF1</i>	YMR228W	Factor específico de la ARN polimerasa, mitocondrial	3,5	3,7	98
<i>PAB1</i>	YER165W	Proteína de unión a la cola Poli (A) del ARNm, implicada en el control de su longitud	4,3	3,9	CST
<i>NOP1</i>	YDL014W	Proteína nucleolar similar a la fibrilarina de mamíferos	2,9	3,3	CST
<i>UTP4</i>	YDR324C	Proteína nuclear, componente de la subunidad pequeña del procesoma que contiene el U3 snoARN	2,0	2,4	CST
<i>RPF2</i>	YKR081C	Proteína esencial implicada en el procesamiento del pre-ARNr y el ensamblaje de la subunidad 60S del ribosoma	3,8	3,3	105
<i>EFB1</i>	YAL003W	Factor de elongación eEF1β	3,0	3,5	95
Metabolismo de carbohidratos (6 genes)					
<i>RGT1<sup>a</sup></i>	YKL038W	Factor de transcripción que regula la expresión de algunos transportadores tipo <i>HXT</i> en respuesta a glucosa.	19,8	19,1	CST
<i>ATF2</i>	YGR177C	Alcohol acetiltransferasa	3,9	3,2	90
<i>GPH1<sup>a</sup></i>	YPR160W	Glucógeno fosforilasa no esencial	3,5	3,7	87
<i>TAL1</i>	YLR354C	Transaldolasa, isoforma 1	3,3	3,5	92
<i>GND1</i>	YHR183W	6-Fosfogluconato deshidrogenasa	2,9	3,1	96
<i>ACO1</i>	YLR304C	Aconitato hidratasa (aconitasa)	3,2	3,2	103
Funciones mitocondriales, energía y metabolismo redox (5 genes)					
<i>GPH1<sup>a</sup></i>	YPR160W	Glucógeno fosforilasa no esencial	3,5	3,7	87
<i>QCR9</i>	YGR183C	Subunidad 9 del complejo Ubiquinol citocromo c reductasa	2,6	3,1	CST
<i>CYC1</i>	YJR048W	Citocromo c, isoforma 1	3,2	3,4	93
<i>YTA12</i>	YMR089C	Componente, junto con Afg3p, de la ATPasa de membrana mitocondrial m-AAA	3,0	3,0	95
<i>MBA1</i>	YBR185C	Proteína de ensamblaje de la cadena respiratoria	4,2	3,8	87
Metabolismo de aminoácidos y nucleótidos (4 genes)					
<i>CHA1</i>	YCL064C	L-Serina/L-treonina deaminasa	9,2	10,2	CST
<i>FUR1</i>	YHR128W	Uracil fosforibosiltransferasa	3,5	4,1	104
<i>MET6</i>	YER091C	Metionina sintasa independiente de cobalamina	3,6	4,0	CST
<i>SAM1</i>	YLR180W	S-adenosil metionina sintasa	5,6	5,8	97
Metabolismo de lípidos (4 genes)					
<i>ERG3</i>	YLR056W	C-5 esteroles desaturasa	3,4	2,9	CST
<i>ERG25</i>	YGR060W	C-4 esteroles metil oxidasa	3,1	3,5	CST
<i>OLE1</i>	YGL055W	Desaturasa de ácidos grasos	6,2	5,9	86
<i>FAA4</i>	YMR246W	CoA-sintasa de ácidos grasos de cadena larga	3,6	3,4	89
Homeostasis iónica y transporte facilitado (7 genes)					
<i>FRE1</i>	YLR214W	Reductasa de hierro y cobre	3,1	3,3	96
<i>BTN2</i>	YGR142W	Proteína v-SNARE que facilita la recuperación proteica desde el endosoma hasta el aparato de Golgi	4,5	4,6	CST

Tabla 9. Continuación.

Gen	ORF	Descripción del producto génico	Tasa de represión en <i>microarrays</i>	Tasa de represión en Q-RT-PCR	Inhibición en mutantes (%)
<i>PMP2</i>	YEL017C-A	Proteolípido que regula la actividad de la protón-ATPasa Pma1p	2,9	3,0	87
<i>PHO88</i>	YBR106W	Proteína transmembrana implicada en el transporte de fosfato	3,1	3,2	96
<i>CTR1</i>	YPR124W	Proteína de membrana de alta afinidad para el transporte de Cu <sup>2+</sup>	3,3	4,0	104
<i>PMA1</i>	YGL008C	ATPasa de protones de membrana plasmática	2,5	2,6	87
<i>TPO2</i>	YGR138C	Transportador de poliaminas específico de espermina	3,8	3,4	92
Estrés celular y rescate (5 genes)					
<i>HSP30</i>	YCR021C	Proteína de choque térmico	2,4	2,1	98
<i>ECM10</i>	YEL030W	Proteína de choque térmico de la familia de las HSP70	2,4	2,9	86
<i>MRH1</i>	YDR033W	Proteína de membrana relacionada con Hsp30p e Yro2p	2,2	1,9	102
<i>YEN1<sup>a</sup></i>	YER041W	Proteína de función desconocida similar a Rth1p	2,0	2,4	CST
<i>SOD2</i>	YHR008C	Superóxido dismutasa, mitocondrial	1,9	2,1	96
Genes no caracterizados y proteínas de función desconocida (8 genes)					
<i>NOP13</i>	YNL175C	Proteína de función desconocida similar a Nop12p (procesamiento del pre-ARNr 18 S)	2,5	3,1	CST
<i>YHB1</i>	YGR234W	Flavohemoglobina implicada en la detoxificación de ácido nítrico	3,8	3,1	CST
<i>IMD4</i>	YML056C	Inosina monofosfato deshidrogenasa	2,8	2,5	94
<i>YEN1<sup>a</sup></i>	YER041W	Proteína de función desconocida similar a Rth1p	2,0	2,0	CST
<i>ZEO1</i>	YOL109W	Proteína de membrana plasmática que interacciona con Mid2p	3,7	3,4	CST
	YLL044W	Función desconocida	2,6	2,2	CST
	YEL059W	Proteína hipotética	2,8	2,5	CST
	YBL077W	ORF cuestionable	2,0	2,5	93

Genes agrupados en categorías funcionales. NER, reparación por escisión de nucleótido; SNARE, *soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor*; snoARN, ARN nucleolar pequeño; v-SNARE, SNARE vesicular. ORFs<sup>a</sup>, Marcos de lectura abierta incluidos en diferentes categorías. CST, cepa sensible tipo.

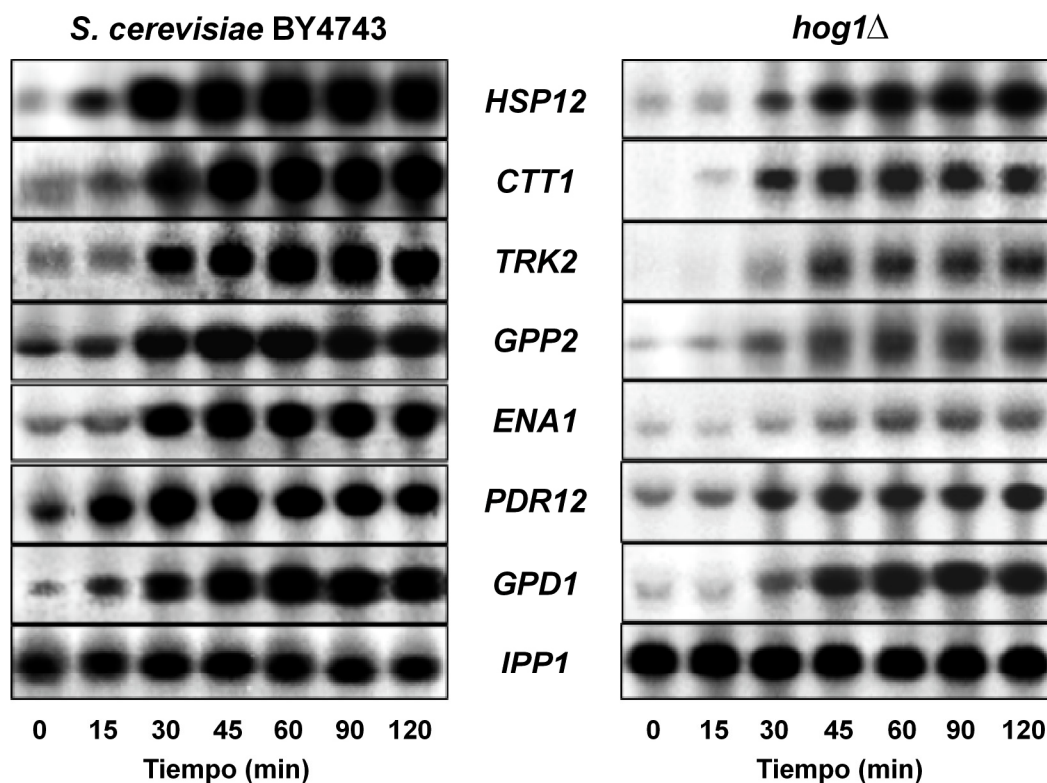
### 4.3 Northern Blot para el análisis de genes cuya expresión se ve condicionada por la presencia de PMKT

El análisis basado en *Northern Blotting* para los siete genes cuya expresión dependía de Hog1p (*HSP12*, *CTT1*, *TRK2*, *GPP2*, *ENA1*, *PDR12* y *GPD1*) reveló que los cambios en los niveles de ARNm como respuesta a la acción de la toxina *killer* PMKT tienen lugar antes de que el proceso de muerte celular ocurra (Figura 11), aproximadamente 30-45 minutos antes de que pueda ser observado cuantitativamente por plaqueo (apartado 4.1).

Los niveles relativos de ARNm detectados mediante auto-radiografía no se redujeron a lo largo del tiempo para restablecer la expresión inicial, estando este proceso posiblemente relacionado con la muerte celular (células incapaces de regular sus niveles de ARNm tras la intoxicación) o con el estímulo permanente de las células activas aún viables.

El mutante *hog1Δ* tuvo una respuesta similar al tratamiento con la toxina *killer* a la de la cepa sensible tipo *S. cerevisiae* BY4743, pero el nivel de ARNm de muchos de los genes inducidos fue varias veces inferior: *ENA1* (18 veces menor); *GPP2* (9 veces); *TRK2*, *GPD1* y *HSP12* (5 veces); *CTT1* (4 veces) y *PDR12* (2,5 veces).

A



B

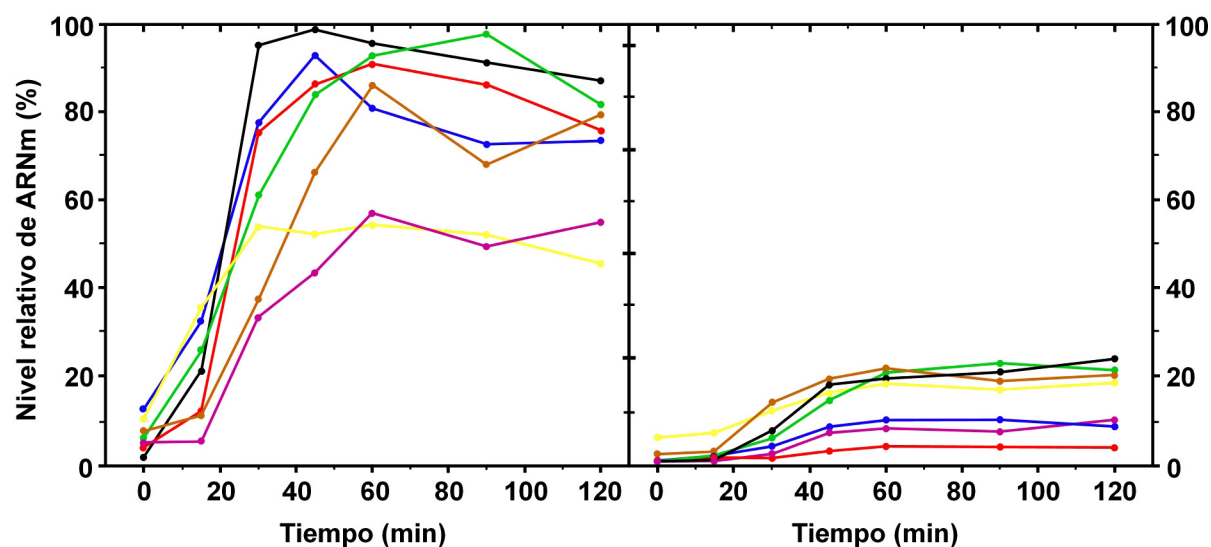


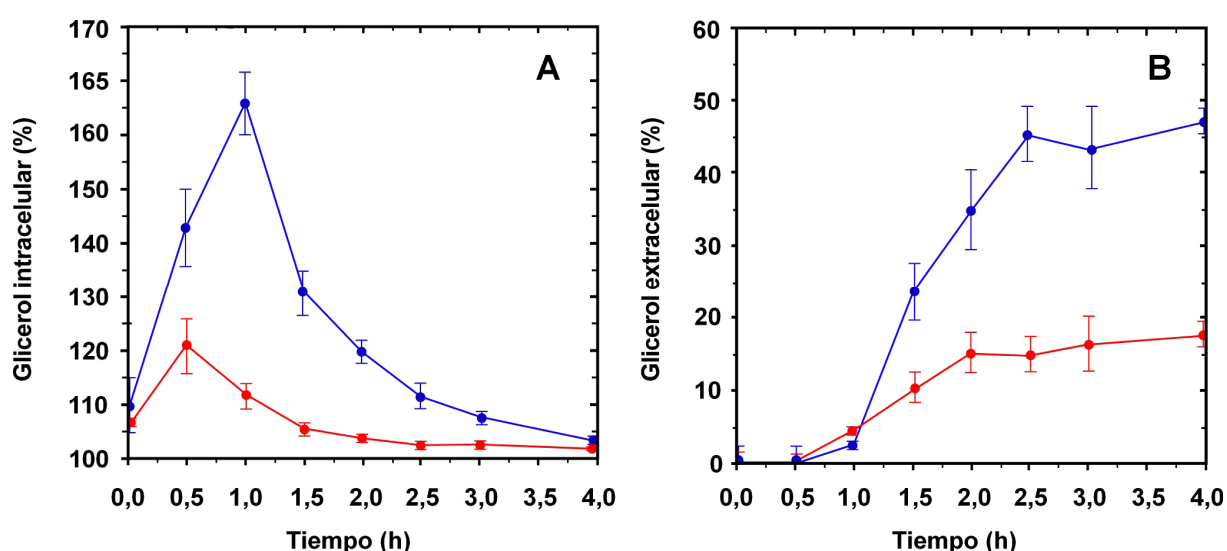
Figura 11. Northern Blot para el análisis de la expresión de los siete genes dependientes de Hog1p (*HSP12*, *CTT1*, *TRK2*, *GPP2*, *ENA1*, *PDR12* y *GPD1*) tras la exposición de la cepa sensible tipo *S. cerevisiae* BY4743 y el mutante *Hog1Δ* a la toxina PMKT. (A) Northern Blotting; (B) Cuantificación. *HSP12* (●), *CTT1* (○), *TRK2* (●), *GPP2* (●), *ENA1* (●), *PDR12* (●) y *GPD1* (●). El mayor nivel de expresión relativa de ARNm detectado en la cepa sensible tipo se consideró como el 100%.



#### 4.4 Determinación de glicerol

El análisis de los resultados obtenidos mostró que el tratamiento con PMKT indujo en la levadura sensible la síntesis de glicerol, pudiéndose observar este proceso desde los primeros 30 minutos tras la adición de la toxina. En los mutantes *hog1Δ*, hipersensibles a la acción de PMKT, se pudo comprobar el mismo resultado, siendo la acumulación intracelular de glicerol menor que en el caso anterior (Figura 12, A).

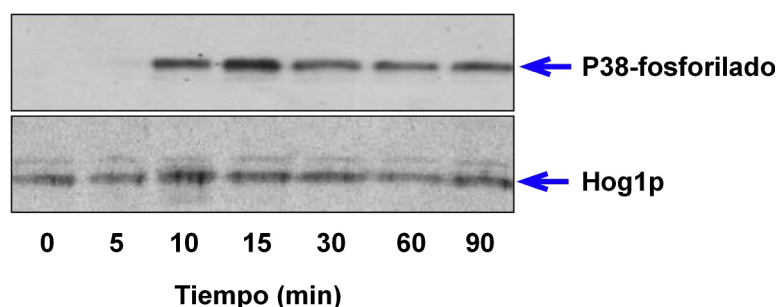
El nivel extracelular de glicerol se incrementó de forma constante durante las cuatro horas de tratamiento con la toxina *killer*, tanto en el caso de la cepa parental tipo como en el del mutante *hog1Δ* (Figura 12, B), indicando la existencia de una pérdida del glicerol sintetizado.



**Figura 12.** Cinéticas de producción intracelular de glicerol total (A) y de acumulación de glicerol extracelular (B) en la cepa sensible tipo *S. cerevisiae* BY4743 (●) y el mutante *hog1Δ* (●) tras el tratamiento con la toxina PMKT. Los resultados se expresan como el porcentaje de glicerol con respecto a la cantidad presente justo antes de poner en contacto la toxina con la cepa sensible tipo.

#### 4.5 Detección por Western Blot de Hog1p y fosforilación de Hog1p

La fosforilación de la proteína Hog1p, que constituye la primera etapa de activación de la ruta metabólica HOG, se detectó rápidamente tras la exposición de la levadura sensible *S. cerevisiae* BY4743 a PMKT. La inmunodetección reveló que este proceso de fosforilación tuvo lugar en los 10 primeros minutos de exposición a la toxina *killer*, no detectándose la señal del anticuerpo anti-MAPK p38-dualmente fosforilado a tiempos 0 y 5 minutos. Durante el resto del experimento la señal permaneció constante, indicando la activación permanente de la ruta de señalización HOG como parte del mecanismo de respuesta a la acción de la toxina (Figura 13).



**Figura 13. Análisis de la expresión y estado de fosforilación de Hog1p en *S. cerevisiae* BY4743 por Western Blot.** La fosforilación de Hog1p se detectó empleando un anticuerpo anti-MAPK p38-dualmente fosforilado (Thr174 y Tyr176). En el caso de Hog1p, se empleó un anticuerpo frente al extremo C-terminal de Hog1p. La presencia de la proteína se confirmó desde el inicio hasta el final del experimento, observándose su activación por fosforilación a partir de los 10 primeros minutos tras la exposición a la toxina *killer* PMKT.

#### 4.6 Estudios de sensibilidad a la toxina PMKT mediante el empleo de mutantes de delección. Análisis de la respuesta transcripcional global

Como puede observarse en la tabla 8, de forma general pudo establecerse una relación directa entre el nivel de inducción de los genes regulados positivamente y la presencia de fenotipos hipersensibles en los mutantes estudiados. Sin embargo, el caso particular del mutante defectivo *hog1Δ* resultó ser una excepción muy significativa a este respecto, encontrando un alto porcentaje de hipersensibilidad a la toxina (180%) y una tasa de sobreexpresión muy reducida (0,4-0,8). Los mutantes defectivos para genes implicados en la respuesta a estrés osmótico (*YAP1*, *HAL9*, *PBS2*, *GPP1*, *GPP2*, *GPD1*, *PSR1*, *IST1*, *NHA1*, *ENA1*, *TRK2*, *HSP12*, *CTT1*, *CSF1*) fueron altamente hipersensibles a la acción de la toxina PMKT. De ellos, el grupo de mutantes para genes relacionados con la síntesis de glicerol (*GPP2*, *GPD1*) fueron los que mostraron los mayores porcentajes de hipersensibilidad.

De forma opuesta a lo sucedido en el caso anterior, no pudo establecerse una relación clara entre el grado de sensibilidad a la toxina *killer* y el nivel de expresión de los genes reprimidos (Tabla 9). En términos generales, podría hablarse de una tendencia para obtener mutantes resistentes a la intoxicación (47%) y de mutantes con la misma sensibilidad mostrada por la cepa sensible tipo (36%).

#### 4.7 Determinación del receptor de PMKT. Estudios de sensibilidad a la toxina *killer* mediante el empleo de mutantes de delección

El primer paso en la caracterización del receptor de PMKT fue determinar su localización, bien en la pared celular o bien en la membrana plasmática de las células

sensibles. Para ello, una colección de 288 mutantes (viables) de genes que codificaban proteínas localizadas o relacionadas con la periferia celular según SGD se seleccionó y se utilizó para llevar a cabo estudios de sensibilidad a la acción de la toxina *killer* (Tabla 10). Se observaron 104 mutantes con una tasa de sensibilidad a PMKT alterada, de los cuales 29 se mostraron más resistentes a la intoxicación que la célula sensible tipo. Entre ellos, solamente el mutante *cwp2Δ* resultó ser completamente resistente, mientras que otros genes (*CWP1*, *LAS21*, *DFG5*, *KNH1*, *CCW14*, *KRE1*, *GAS1*, *EXG2*, *GAS4*, *SPS22*), muchos de ellos implicados en procesos estructurales o de síntesis de la pared celular, al ser eliminados mostraron un alto grado de resistencia (< 85%).

#### 4.8 Regeneración de los protoplastos tras el tratamiento con la toxina PMKT

La actividad de la toxina *killer* frente a los protoplastos obtenidos a partir de mutantes de delección se determinó por la tasa de regeneración de estos en un medio específico tras ser expuestos a PMKT. Como puede observarse en la tabla 10, un total de 88 mutantes presentaron una tasa de regeneración alterada, siendo la de 15 de ellos (resaltados en color azul) mayor en comparación con la mostrada por los protoplastos de la cepa sensible tipo. Del mismo modo que sucedió en el caso anterior (apartado 4.7), el cambio fenotípico más significativo pudo observarse en el mutante *cwp2Δ*, que presentaba el mayor grado de resistencia a la toxina con un porcentaje de regeneración de un 242%. Por el contrario, el mutante con mayor sensibilidad fue *pma2Δ*, con una tasa de regeneración del 11% (Tabla 10).

#### 4.9 Ensayos de unión de la toxina a protoplastos y a células completas

Se incubaron células completas o protoplastos de los 288 mutantes de delección en presencia de PMKT y posteriormente centrifugados para determinar la cantidad de toxina presente en el sobrenadante. Por un lado, pudo comprobarse que la capacidad de unión de PMKT a células completas de 30 mutantes de delección se vio alterada, observando en la mayoría de los casos una disminución de ésta con respecto a la de la cepa sensible tipo (Tabla 10). Por otro lado, los protoplastos de 13 mutantes de delección mostraron una capacidad de unión diferente con respecto a los protoplastos de la cepa parental tipo *S. cerevisiae* BY4744. Entre ellos, sólo en los protoplastos de los mutantes *las21Δ*, *dfg5Δ* y *cwp2Δ* se detectaron reducciones significativas en su capacidad para retener toxina (Tabla 10).

**Tabla 10.** Análisis de la actividad *killer* de la toxina PMKT frente a mutantes, células completas y protoplastos, de genes no esenciales que codifican proteínas localizadas o relacionadas con la periferia celular según SGD. En la tabla se incluye la capacidad de unión a células completas y protoplastos.

ORF	Gen	Descripción del producto génico	(A) Inhibición en mutantes (%)	(B) Regeneración de protoplastos (%)	(C) Capacidad de unión (%)	
					Células	Protoplastos
YAL026C	<i>DRS2</i>	Enzima translocadora de aminofosfolípidos que interviene en la formación de vesículas secretoras	CST	CST	CST	CST
YAL056W	<i>GPB2</i>	Regulador de la ruta de señalización AMPc-PAK. Homólogo de la proteína Gpb1p	CST	CST	CST	CST
YAR031W	<i>PRM9</i>	Proteína regulada por feromonas	CST	CST	CST	CST
YBL037W	<i>APL3</i>	$\alpha$ -Adaptina. Implicada en el transporte de vesículas	105	90	CST	CST
YBL042C	<i>FUI1</i>	Uridina permeasa de alta afinidad	CST	CST	CST	CST
YBL106C	<i>SRO77</i>	Proteína implicada en exocitosis y en homeostasis de cationes	121	79	CST	CST
YBR008C	<i>FLR1</i>	Proteína de membrana transportadora de múltiples drogas	108	96	CST	CST
YBR016W		Proteína de membrana plasmática de función desconocida	120	68	CST	CST
YBR021W	<i>FUR4</i>	Uracil-permeasa	103	CST	CST	CST
YBR041W	<i>FAT1</i>	Transportador de ácidos grasos y acil-CoA sintasa de ácidos grasos de cadena larga	CST	CST	CST	CST
YBR043C	<i>QDR3</i>	Proteína de membrana transportadora de múltiples drogas	116	95	CST	CST
YBR068C	<i>BAP2</i>	Leucina permeasa de alta afinidad	103	95	CST	CST
YBR069C	<i>TAT1</i>	Proteína transportadora de aminoácidos	CST	CST	CST	CST
YBR078W	<i>ECM33</i>	Proteína con anclaje tipo GPI de función desconocida	119	CST	CST	CST
YBR086C	<i>IST2</i>	Proteína de membrana plasmática posiblemente implicada en procesos de osmotolerancia	111	90	CST	CST
<b>YBR108W</b>	<b><i>AIM3</i></b>	<b>Proteína que interactúa con Rsv167p</b>	<b>CST</b>	<b>102</b>	<b>CST</b>	<b>CST</b>
YBR132C	<i>AGP2</i>	Poliamina permeasa de alta afinidad	98	CST	CST	CST
YBR294W	<i>SUL1</i>	Sulfato permeasa de alta afinidad	104	83	CST	105
YBR296C	<i>PHO89</i>	Proteína transportadora de fosfato acoplada a Na <sup>+</sup> ; alta afinidad	115	91	CST	CST
YCL025C	<i>AGP1</i>	Permeasa de aminoácidos de baja afinidad	CST	CST	CST	CST
YCL027W	<i>FUS1</i>	Proteína de membrana requerida para la fusión celular	CST	CST	CST	CST
YCL048W	<i>SPS22</i>	Proteína de función desconocida	78	CST	91	CST
YCR009C	<i>RVS161</i>	Proteína de membrana de tipo anifisina	88	76	CST	CST
YCR017C	<i>CWH43</i>	Proteína (sensor/transportador) posiblemente implicada en la síntesis de la pared celular	86	CST	86	CST
<b>YCR021C</b>	<b><i>HSP30</i></b>	<b>Proteína de respuesta a estrés que regula negativamente la protón-ATPasa Pma1p</b>	<b>97</b>	<b>114</b>	<b>CST</b>	<b>CST</b>
<b>YCR024C-A</b>	<b><i>PMP1</i></b>	<b>Proteolípido que funciona como subunidad reguladora de la protón-ATPasa Pma1p</b>	<b>108</b>	<b>120</b>	<b>CST</b>	<b>CST</b>
YCR027C	<i>RHB1</i>	Posible GTPasa relacionada con Rheb	CST	CST	CST	CST
<b>YCR028C</b>	<b><i>FEN2</i></b>	<b>Transportador de membrana tipo simporte H(+)-pantotenato</b>	<b>114</b>	<b>133</b>	<b>CST</b>	<b>CST</b>
YCR098C	<i>GIT1</i>	Permeasa de membrana plasmática	105	88	CST	CST
YDL012C		Proteína de membrana plasmática de función desconocida	CST	CST	CST	CST

Tabla 10. Continuación.

ORF	Gen	Descripción del producto génico	(A) Inhibición en mutantes (%)	(B) Regeneración de protoplastos (%)	(C) Capacidad de unión (%)	
					Células	Protoplastos
YDL019C	<i>OSH2</i>	Miembro de la superfamilia de proteínas de unión a oxisterol	CST	CST	CST	CST
YDL035C	<i>GPR1</i>	Receptor de membrana a una proteína G (GPCR) que interacciona con Gpa2p y Plc1p	CST	CST	CST	CST
<b>YDL138W</b>	<b><i>RG72</i></b>	<b>Receptor de glucosa localizado en la membrana plasmática</b>	<b>107</b>	<b>119</b>	<b>CST</b>	<b>CST</b>
<b>YDL194W</b>	<b><i>SNF3</i></b>	<b>Sensor de glucosa localizado en la membrana plasmática</b>	<b>105</b>	<b>117</b>	<b>CST</b>	<b>CST</b>
YDR011W	<i>SNQ2</i>	Transportador de proteínas de tipo ABC	91	86	CST	CST
YDR033W	<i>MRH1</i>	Proteína localizada en la membrana plasmática y en la envuelta nuclear	102	80	CST	CST
YDR046C	<i>BAP3</i>	Permeasa de aminoácidos	CST	CST	CST	CST
YDR093W	<i>DNF2</i>	Enzima translocadora de aminofosfolípidos localizada principalmente en la membrana plasmática	CST	CST	CST	CST
YDR103W	<i>STE5</i>	Proteína implicada en la respuesta a feromonas	CST	CST	CST	CST
YDR122W	<i>KIN1</i>	Serina/treonina quinasa implicada en endocitosis	CST	CST	CST	CST
YDR276C	<i>PMP3</i>	Proteína de membrana relacionada con ciertos polipéptidos de plantas	121	87	CST	CST
YDR345C	<i>HXT3</i>	Transportador de glucosa de baja afinidad	CST	CST	CST	CST
YDR384C	<i>ATO3</i>	Proteína de membrana posiblemente implicada en el exporte de amonio de la célula	CST	CST	CST	CST
YDR420W	<i>HKR1</i>	Proteína de la superficie celular rica en residuos de serina/treonina	91	CST	98	CST
YDR497C	<i>ITR1</i>	Transportador de mioinositol	CST	CST	CST	CST
YDR508C	<i>GNP1</i>	Glutamina permeasa de alta afinidad	CST	CST	CST	CST
YDR536W	<i>STL1</i>	Cotransportador glicerol/H <sup>+</sup> localizado en la membrana plasmática	132	34	CST	CST
YEL063C	<i>CAN1</i>	Arginina permeasa de membrana plasmática	CST	CST	CST	CST
YER020W	<i>GPA2</i>	Subunidad $\alpha$ de la proteína G heterotrimérica que interacciona con Gpr1p	CST	CST	CST	CST
YER056C	<i>FCY2</i>	Permeasa de purina/citosina	CST	CST	CST	CST
YER118C	<i>SHO1</i>	Osmosensor transmembrana	124	68	CST	CST
YER123W	<i>YCK3</i>	Isoforma I de la caseína quinasa localizada en la membrana vacuolar	122	78	CST	CST
YER143W	<i>DDI1</i>	Proteína v-SNARE inducida por daño en el ADN	CST	CST	CST	CST
YER145C	<i>FTR1</i>	Permeasa de hierro de alta afinidad	CST	CST	CST	CST
YER166W	<i>DNF1</i>	Enzima translocadora de aminofosfolípidos localizada principalmente en la membrana plasmática	133	79	CST	CST
YFL011W	<i>HXT10</i>	Posible transportador de hexosas	CST	CST	CST	CST
YFL014W	<i>HSP12</i>	Proteína de choque térmico (HSP; <i>Heat Shock Protein</i> ) localizada en la membrana plasmática que protege frente a desecación	141	64	CST	CST
YFL026W	<i>STE2</i>	Receptor para el factor $\alpha$ (feromonas)	CST	CST	CST	CST
YFL050C	<i>ALR2</i>	Posible transportador de Mg <sup>2+</sup>	CST	CST	CST	CST
YFL055W	<i>AGP3</i>	Permeasa de aminoácidos de baja afinidad	CST	CST	CST	CST
YGL053W	<i>PRM8</i>	Proteína regulada por feromonas	CST	CST	CST	CST

Tabla 10. Continuación.

ORF	Gen	Descripción del producto génico	(A) Inhibición en mutantes (%)	(B) Regeneración de protoplastos (%)	(C) Capacidad de unión (%)	
					Células	Protoplastos
YGL077C	<i>HNH1</i>	Transportador de cloro/etanolamina	CST	CST	CST	CST
YGL084C	<i>GUP1</i>	Proteína de membrana implicada en modificaciones del sistema de anclaje GPI	129	73	CST	CST
YGL115W	<i>SNF4</i>	Subunidad y activadora del complejo quinasa Snf1p	CST	CST	CST	CST
YGL208W	<i>SIP2</i>	Una de las tres subunidades $\beta$ del complejo quinasa Snf1p	CST	CST	CST	CST
YGL255W	<i>ZRT1</i>	Proteína transportadora de zinc de alta afinidad	109	CST	CST	CST
YGR014W	<i>MSB2</i>	Miembro de la familia de la mucina	CST	CST	CST	CST
YGR023W	<i>MTL1</i>	Proteína que presenta similitud estructural y funcional con Mid2p	CST	CST	CST	CST
<b>YGR032W</b>	<b>GSC2</b>	<b>Subunidad catalítica de la (1→3)-<math>\beta</math>-D-glucano sintasa</b>	<b>110</b>	<b>104</b>	<b>109</b>	<b>CST</b>
YGR055W	<i>MUP1</i>	Metionina permeasa de alta afinidad	CST	CST	CST	CST
YGR121C	<i>MEP1</i>	Permeasa de amonio	CST	CST	CST	CST
YGR138C	<i>TPO2</i>	Proteína transportadora específica de espermina	92	CST	CST	CST
YGR152C	<i>RSR1</i>	Proteína de unión a GTP perteneciente a la superfamilia Ras	CST	CST	CST	CST
YGR212W	<i>SLI1</i>	N-acetil transferasa	CST	CST	CST	CST
<b>YGR217W</b>	<b>CCH1</b>	<b>Canal de calcio de alta afinidad voltaje-dependiente</b>	<b>104</b>	<b>102</b>	<b>CST</b>	<b>CST</b>
YGR224W	<i>AZR1</i>	Transportador de membrana plasmática	128	87	CST	CST
YGR260W	<i>TNA1</i>	Permeasa de ácido nicotínico de alta afinidad situada en la membrana plasmática	CST	CST	CST	CST
YGR266W		Proteína de función desconocida	108	86	CST	CST
YGR281W	<i>YOR1</i>	Transportador de tipo ABC localizado en la membrana plasmática	CST	CST	CST	CST
YHL016C	<i>DUR3</i>	Transportador de urea/poliaminas localizada en la membrana plasmática	CST	CST	CST	CST
YHL044W		Posible proteína integral de membrana	CST	CST	CST	CST
YHL047C	<i>ARN2</i>	Miembro de la familia de transportadores de ARN	CST	CST	CST	CST
YHR005C	<i>GPA1</i>	Subunidad $\alpha$ de la proteína G heterotrimérica que interacciona con receptores de feromonas	CST	CST	CST	CST
YHR092C	<i>HXT4</i>	Transportador de glucosa de alta afinidad	104	98	CST	CST
YHR094C	<i>HXT1</i>	Transportador de glucosa de baja afinidad	CST	96	CST	CST
YHR096C	<i>HXT5</i>	Proteína de la familia <i>HXT</i> con actividad intrínseca de transporte de hexosa. Aporte de azúcar	131	83	CST	CST
YHR135C	<i>YCK1</i>	Isoforma I de la caseína quinasa localizada en la membrana plasmática	CST	CST	CST	CST

Tabla 10. Continuación.

ORF	Gen	Descripción del producto génico	(A) Inhibición en mutantes (%)	(B) Regeneración de protoplastos (%)	(C) Capacidad de unión (%)	
					Células	Protoplastos
YIL047C	<i>SYG1</i>	Proteína de membrana de función desconocida	CST	CST	CST	CST
YIL105C	<i>SLM1</i>	Proteína de unión a fosfoinositol	CST	CST	CST	CST
YIL120W	<i>QDR1</i>	Proteína multitransportadora de drogas	114	89	CST	CST
YIL121W	<i>QDR2</i>	Proteína multitransportadora de drogas	108	93	CST	CST
YIL140W	<i>AXL2</i>	Proteína integral de membrana requerida para el proceso de gemación axial en células haploides	CST	CST	CST	CST
YIR019C	<i>MUC1</i>	Glicoproteína unida a la superficie celular mediante sistema de anclaje GPI que interviene en la formación de pseudomicelio	CST	CST	CST	CST
<b>YJL062W</b>	<b>LAS21</b>	<b>Proteína integral de membrana plasmática implicada en la síntesis del sistema de anclaje GPI</b>	<b>21</b>	<b>180</b>	<b>38</b>	<b>3</b>
YJL093C	<i>TOK1</i>	Transportador de K <sup>+</sup> de membrana plasmática voltaje dependiente	109	86	CST	CST
YJL100W	<i>LSB6</i>	Quinasa que se une a Las17p	CST	CST	CST	CST
YJL129C	<i>TRK1</i>	Componente del sistema de transporte de potasio Trk1p-Trk2p	135	65	CST	CST
YJL158C	<i>CIS3</i>	Glicoproteína constituyente de la pared celular que contiene residuos de manosa	CST	CST	CST	CST
YJL170C	<i>ASG7</i>	Proteína que regula la señalización procedente de una subunidad β de Ste4p	CST	CST	CST	CST
YJL212C	<i>OPT1</i>	Cotransportador H <sup>+</sup> /oligopéptido localizado en la membrana plasmática	CST	CST	CST	CST
YJL214W	<i>HXT8</i>	Proteína de función desconocida con similitud al resto de los miembros de la familia <i>HXT</i>	102	94	CST	CST
YJR005W	<i>APL1</i>	β-Adaptina. Subunidad grande del complejo proteico AP-2	CST	CST	CST	CST
YJR058C	<i>APS2</i>	Subunidad pequeña del complejo proteico AP-2	CST	CST	CST	CST
YJR059W	<i>PTK2</i>	Posible serina/treonina quinasa implicada en la regulación del transporte de iones a través de la membrana plasmática	108	93	CST	CST
YJR066W	<i>TOR1</i>	Proteína quinasa	CST	CST	CST	CST
YJR152W	<i>DAL5</i>	Permeasa de alantoína y ureidosuccinato	CST	CST	CST	CST
YKL046C	<i>DCW1</i>	Proteína de membrana anclada a GPI con posible actividad manosidasa	115	CST	110	CST
YKL051W	<i>SFK1</i>	Proteína de membrana que regula los niveles de fosfolípidos PIP4	103	95	101	CST
YKL126W	<i>YPK1</i>	Serina/treonina quinasa requerida para los procesos de endocitosis mediados por receptores	108	93	CST	CST
YKL178C	<i>STE3</i>	Receptor para el factor a requerido en el proceso de <i>mating</i> (células α)	CST	99	CST	CST
YKL209C	<i>STE6</i>	Transportador de membrana tipo ABC requerido para exportar el factor a	102	CST	CST	CST
YKL217W	<i>JEN1</i>	Transportador de lactato	CST	CST	CST	CST
YKL220C	<i>FRE2</i>	Reductasa de hierro y cobre	CST	CST	CST	CST
YKR039W	<i>GAP1</i>	Permeasa de aminoácidos localizada en la membrana plasmática	CST	CST	CST	CST
YKR050W	<i>TRK2</i>	Componente del sistema de transporte de potasio Trk1p-Trk2p	121	83	CST	CST

Tabla 10. Continuación.

ORF	Gen	Descripción del producto génico	(A) Inhibición en mutantes (%)	(B) Regeneración de protoplastos (%)	(C) Capacidad de unión (%)	
					Células	Protoplastos
YKR093W	<i>PTR2</i>	Transportador de péptidos integral de membrana	CST	CST	CST	CST
YLL010C	<i>PSR1</i>	Fosfatasa de membrana plasmática implicada en la respuesta a estrés general	127	71	CST	CST
YLL028W	<i>TPO1</i>	Transportador de poliaminas	CST	CST	CST	CST
YLL043W	<i>FPS1</i>	Canal de membrana plasmática (familia MIP) para la salida de glicerol. También implicado en la entrada de arsenito y antimonito	110	96	CST	CST
YLL052C	<i>AQY2</i>	Canal que media el transporte de agua a través de la membrana plasmática	105	92	CST	CST
YLL054C		Posible proteína de función desconocida similar a Pip2p	CST	CST	CST	CST
YLL061W	<i>MMP1</i>	Permeasa de S-metilmethionina de alta afinidad	CST	CST	CST	CST
YLR019W	<i>PSR2</i>	Fosfatasa de membrana plasmática implicada en la respuesta a estrés general	109	91	CST	CST
YLR020C	<i>YEH2</i>	Hidrolasa de éster estéril	CST	CST	CST	CST
YLR081W	<i>GAL2</i>	Galactosa permeasa	CST	CST	CST	CST
YLR092W	<i>SUL2</i>	Sulfato permeasa de alta afinidad	CST	CST	CST	CST
YLR096W	<i>KIN2</i>	Serina/treonina quinasa implicada en la regulación de la exocitosis	CST	CST	CST	CST
YLR121C	<i>YPS3</i>	Proteasa anclada a la membrana plasmática mediante una molécula GPI	109	93	99	93
YLR130C	<i>ZRT2</i>	Transportador de zinc de baja afinidad localizado en la membrana plasmática	CST	CST	CST	CST
YLR138W	<i>NHA1</i>	Intercambiador Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> implicado en la salida de Na <sup>+</sup> y K <sup>+</sup> a través de la membrana plasmática	136	62	CST	CST
<b>YLR194C</b>		<b>Constituyente de la pared celular anclado a la membrana plasmática mediante una molécula GPI</b>	<b>93</b>	<b>124</b>	<b>90</b>	<b>86</b>
YLR214W	<i>FRE1</i>	Reductasa de hierro y cobre	96	CST	CST	CST
YLR237W	<i>THI7</i>	Transportador de membrana responsable de la entrada en la célula de tiamina	CST	CST	CST	CST
YLR332W	<i>MID2</i>	Proteína de membrana plasmática O-glicosilada que interviene en el proceso de señalización en la ruta de la integridad celular como sensor	CST	CST	CST	CST
YLR342W	<i>FKS1</i>	Subunidad catalítica de (1→3)-β-D-glucano sintasa	104	93	96	91
YLR373C	<i>VID22</i>	Proteína glicosilada integrada en la membrana plasmática	CST	CST	CST	CST
YLR452C	<i>SST2</i>	Proteína de activación para Gpa1p	CST	CST	CST	CST
YML052W	<i>SUR7</i>	Posible proteína integral de membrana	CST	CST	CST	CST
YML116W	<i>ATR1</i>	Bomba de expulsión de múltiples drogas	CST	CST	CST	CST
<b>YML123C</b>	<b><i>PHO84</i></b>	<b>Permeasa de fosfato inorgánico y manganeso</b>	<b>112</b>	<b>103</b>	<b>CST</b>	<b>CST</b>
YMR011W	<i>HXT2</i>	Transportador de glucosa de alta afinidad	104	96	CST	CST
YMR058W	<i>FET3</i>	Hierro-O <sub>2</sub> -oxidoreductasa	CST	CST	CST	CST
YMR183C	<i>SSO2</i>	Proteína t-SNARE localizada en la membrana plasmática implicada en la fusión de vesículas secretoras	CST	CST	CST	CST
YMR192W	<i>GYL1</i>	Posible proteína tipo GAP	CST	CST	CST	CST



Tabla 10. Continuación.

ORF	Gen	Descripción del producto génico	(A) Inhibición en mutantes (%)	(B) Regeneración de protoplastos (%)	(C) Capacidad de unión (%)	
					Células	Protoplastos
YMR238W	DFG5	Proteína anclada a la membrana plasmática mediante GPI requerida para la formación de yemas en la división celular	82	158	53	38
YMR251W-A	HOR7	Proteína de función desconocida	109	101	CST	CST
YMR275C	BUL1	Componente del complejo E3-ubiquitina ligasa Rsp5p	CST	CST	CST	CST
YMR307W	GAS1	(1→3)-β-glucanosil transferasa. Requerida en la síntesis de la pared celular	80	CST	93	CST
YMR319C	FET4	Transportador de Fe(II) de baja afinidad localizado en la membrana plasmática	CST	CST	CST	CST
YNL065W	AQR1	Proteína multitransportadora de drogas localizada en la membrana plasmática	CST	CST	CST	CST
YNL098C	RAS2	Proteína de unión a GTP	CST	CST	CST	CST
YNL142W	MEP2	Permeasa de amonio implicada en la regulación del proceso de pseudofilamentación	CST	CST	CST	CST
YNL154C	YCK2	Isoforma I de la caseína quinasa localizada en la membrana plasmática	CST	CST	CST	CST
YNL173C	MDG1	Proteína de membrana implicada en la ruta de señalización de respuesta a feromonas	CST	CST	CST	CST
YNL192W	CHS1	Quitina sintasa I	CST	CST	CST	CST
YNL268W	LYP1	Lisina permeasa	CST	CST	CST	CST
YNL270C	ALP1	Transportador de aminoácidos básicos	CST	CST	CST	CST
YNL275W	BOR1	Transportador de boro localizado en la membrana plasmática	117	93	CST	CST
YNL291C	MID1	Proteína N-glicosilada integrada en la membrana del retículo endoplasmático	CST	CST	CST	CST
YNL318C	HXT14	Proteína similar a algunos de los miembros de transportadores de hexosas. Inducido en medios con baja disponibilidad de glucosa	112	89	CST	CST
YNR055C	HOL1	Posible transportador de iones	109	85	CST	CST
YNR056C	BIO5	Posible proteína de membrana implicada en la síntesis de biotina	CST	CST	CST	CST
YNR060W	FRE4	Reductasa férrica	CST	CST	CST	CST
YNR072W	HXT17	Miembro de la familia de transportadores de hexosa	CST	97	CST	CST
YNR074C	AIF1	Factor mitocondrial que participa en la apoptosis	CST	CST	CST	CST
YOL011W	PLB3	Fosfolipasa B implicada en el metabolismo de fosfolípidos	CST	CST	CST	CST
YOL019W		Proteína de función desconocida	CST	CST	CST	CST
YOL020W	TAT2	Permeasa de triptófano y tirosina de alta afinidad	CST	CST	CST	CST
YOL062C	APM4	Subunidad tipo Mu2 del complejo proteico AP-2	CST	CST	CST	CST
YOL103W	ITR2	Transportador de mioinositol	CST	CST	CST	CST
YOL109W	ZEO1	Proteína de membrana que interacciona con Mid2p	CST	CST	CST	CST
YOL122C	SMF1	Transportador de iones divalentes	CST	94	CST	CST
YOR008C	SLG1	Sensor/transductor de la ruta quinasa inducida por estrés PKC1-MPK1	120	87	CST	CST
YOR018W	ROD1	Proteína de membrana plasmática unida a Rsp5p	CST	CST	CST	CST

Tabla 10. Continuación.

ORF	Gen	Descripción del producto génico	(A) Inhibición en mutantes (%)	(B) Regeneración de protoplastos (%)	(C) Capacidad de unión (%)	
					Células	Protoplastos
YOR047C	<i>STD1</i>	Proteína implicada en el control de la expresión de genes regulados por niveles de glucosa	105	91	CST	CST
YOR049C	<i>RSB1</i>	Posible proteína que transporta LCBs a la cara externa de la membrana plasmática	CST	CST	CST	CST
YOR101W	<i>RAS1</i>	GTPasa implicada en procesos de señalización celular	110	91	CST	CST
YOR153W	<i>PDR5</i>	Transportador de membrana de tipo ABC	102	83	CST	CST
YOR161C	<i>PNS1</i>	Proteína de función desconocida	CST	CST	CST	CST
YOR212W	<i>STE4</i>	Subunidad $\beta$ de la proteína G implicada en la señalización de la ruta de <i>mating</i>	CST	CST	CST	CST
YOR273C	<i>TPO4</i>	Proteína transportadora de poliamina	CST	CST	CST	CST
YOR328W	<i>PDR10</i>	Transportador ABC implicado en la resistencia a drogas pleiotrópicas	114	86	CST	CST
YOR348C	<i>PUT4</i>	Prolina permeasa de alta afinidad	CST	CST	CST	CST
YOR371C	<i>GPB1</i>	Regulador de la ruta de señalización PKA-AMPC	CST	CST	CST	CST
YOR381W	<i>FRE3</i>	Reductasa férrica	CST	CST	CST	CST
YPL036W	<i>PMA2</i>	ATPasa de H <sup>+</sup> localizada en la membrana plasmática. Isoforma de Pma1p	143	11	CST	CST
YPL058C	<i>PDR12</i>	Transportador ABC de membrana plasmática que actúa como una bomba débil de expulsión de ácidos orgánicos	133	84	CST	CST
YPL092W	<i>SSU1</i>	Bomba de sulfito localizada en la membrana plasmática	CST	CST	CST	CST
YPL176C	<i>TRE1</i>	Proteína de membrana que se une a Bsd2p y que regula la ubiquitinación y degradación vacuolar de Smf1p	CST	CST	CST	CST
YPL180W	<i>TCO89</i>	Subunidad del complejo proteico TORC1 (Tor1p o Tor2p-Kog1p-Lst8p-Tco89p)	CST	CST	CST	CST
YPL232W	<i>SSO1</i>	Proteína t-SNARE localizada en la membrana plasmática implicada en la fusión de vesículas secretoras	CST	CST	CST	CST
YPL249C	<i>GYP5</i>	Proteína tipo GAP para proteínas de la familia Rab	CST	CST	CST	CST
YPL265W	<i>DIP5</i>	Permeasa de aminoácidos dicarboxílicos	CST	CST	CST	CST
YPL274W	<i>SAM3</i>	S-adenosilmetionina permeasa de alta afinidad	CST	CST	CST	CST
YPR032W	<i>SRO7</i>	Proteína que constituye un complejo con Sec4p y Sec9p. Implicada en exocitosis y transporte de vesículas	109	93	CST	94
YPR075C	<i>OPY2</i>	Proteína integral de membrana que interviene en la ruta de señalización HOG	112	90	CST	CST
YPR124W	<i>CTR1</i>	Transportador de cobre de alta afinidad localizado en la membrana plasmática	103	CST	CST	CST
YPR138C	<i>MEP3</i>	Amonio permeasa de alta y baja capacidad	109	96	CST	CST
YPR156C	<i>TPO3</i>	Transportador de poliaminas específico de espermina	CST	CST	CST	CST
YPR192W	<i>AQY1</i>	Canal que media el transporte de agua a través de la membrana plasmática	CST	CST	CST	CST
YPR194C	<i>OPT2</i>	Transportador de oligopéptidos	CST	CST	CST	CST
YPR198W	<i>SGE1</i>	Proteína de membrana transportadora de múltiples drogas	115	88	CST	CST

Tabla 10. Continuación.

ORF	Gen	Descripción del producto génico	(A) Inhibición en mutantes (%)	(B) Regeneración de protoplastos (%)	(C) Capacidad de unión (%)	
					Células	Protoplastos
YPR201W	<i>ARR3</i>	Transportador de arsenito localizado en la membrana plasmática	CST	CST	CST	CST
YAL005C	<i>SSA1</i>	ATPasa implicada en el plegamiento de proteínas y su transporte al núcleo	CST	CST	CST	CST
YAR050W	<i>FLO1</i>	Proteína de tipo lectina que interviene en floculación	CST	CST	CST	CST
YBR040W	<i>FIG1</i>	Proteína integral de membrana que interviene en procesos de <i>mating</i>	102	96	CST	CST
YBR067C	<i>TIP1</i>	Manoproteína de pared celular con posible actividad lipasa	CST	CST	CST	CST
YBR093C	<i>PHO5</i>	Fosfatasa ácida	106	92	CST	CST
YBR162C	<i>TOS1</i>	Proteína unida a la pared celular de función desconocida	86	CST	91	CST
YBR301W	<i>DAN3</i>	Manoproteína localizada en la pared celular similar a Tir1p, Tir2p, Tir3p y Tir4p	CST	CST	CST	CST
YCL051W	<i>LRE1</i>	Proteína implicada en el control estructural de la pared celular y la respuesta a estrés	90	98	80	CST
YCR089W	<i>FIG2</i>	Adhesina de pared celular, expresada específicamente durante el proceso de <i>mating</i>	CST	CST	CST	CST
YDL024C	<i>DIA3</i>	Proteína de función desconocida, implicada en invasión y crecimiento pseudofilamentoso	CST	CST	CST	CST
YDL049C	<i>KNH1</i>	Proteína similar a Kre9p, implicada en la síntesis de (1→6)-β-glucanos	80	98	73	CST
YDR055W	<i>PST1</i>	Proteína de pared celular que contiene un posible sitio de unión a GPI	97	85	CST	CST
YDR077W	<i>SED1</i>	Glicoproteína estructural de tipo GPI localizada en la pared celular inducida en condiciones de estrés	129	84	93	CST
YDR104C	<i>SPO71</i>	Proteína específica de meiosis de función desconocida	CST	CST	CST	CST
YDR144C	<i>MKC7</i>	Aspartil proteasa anclada a GPI implicada en el procesamiento de proteínas	CST	CST	CST	CST
YDR261C	<i>EXG2</i>	Exo-(1→3)-β-glucanasa, posiblemente anclada a la membrana mediante GPI e implicada en la síntesis de los (1→3)-β-glucanos de la pared celular	85	91	70	96
YDR522C	<i>SPS2</i>	Proteína expresada durante la esporulación	CST	CST	CST	CST
YDR534C	<i>FIT1</i>	Manoproteína incorporada a la pared celular mediante un anclaje GPI	CST	CST	CST	CST
YEL040W	<i>UTR2</i>	Posible glicosidasa que interviene en la transferencia de quitina a los (1→6)-β-glucanos. Presenta un anclaje tipo GPI	93	93	101	96
YER011W	<i>TIR1</i>	Manoproteína de pared perteneciente a la familia Srp1p/Tip1p	CST	CST	CST	CST
YER150W	<i>SPI1</i>	Proteína anclada mediante GPI a la pared celular que interviene en la resistencia a ácidos débiles	CST	CST	CST	CST
YGL028C	<i>SCW11</i>	Proteína de membrana similar a glucanasas	CST	CST	CST	CST
YGL032C	<i>AGA2</i>	Subunidad de adhesión de la α-aglutinina	CST	CST	CST	CST
YGR059W	<i>SPR3</i>	Homólogo de la familia de genes CDC3/10/11/12 que intervienen específicamente en la esporulación	CST	CST	CST	CST
YGR189C	<i>CRH1</i>	Proteína de pared celular con posible actividad quitina transglicosidasa	94	95	CST	98

Tabla 10. Continuación.

ORF	Gen	Descripción del producto génico	(A) Inhibición en mutantes (%)	(B) Regeneración de protoplastos (%)	(C) Capacidad de unión (%)	
					Células	Protoplastos
YGR192C	<i>TDH3</i>	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa	CST	CST	CST	CST
YGR279C	<i>SCW4</i>	Proteína de pared celular con función similar a glucanasas	CST	CST	CST	CST
YGR282C	<i>BGL2</i>	Endo-(1→3)-β-glucanasa implicada en el mantenimiento de la pared celular	94	83	86	CST
YHR139C	<i>SPS100</i>	Proteína requerida para la maduración de la pared de la espora	CST	CST	CST	CST
YHR143W	<i>DSE2</i>	Proteína con función similar a glucanasas	CST	CST	CST	CST
YIL011W	<i>TIR3</i>	Proteína de pared celular miembro de la familia Srp1p/Tip1p	CST	CST	CST	CST
YIL123W	<i>SIM1</i>	Proteína miembro de la familia SUN (Sim1p, Uth1p, Nca3p, Sun4p)	CST	CST	CST	CST
YIR039C	<i>YPS6</i>	Posible proteasa de aspártico anclada a GPI	CST	CST	CST	CST
YJL052W	<i>TDH1</i>	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, isozima 1	CST	CST	CST	CST
YJL078C	<i>PRY3</i>	Proteína de función desconocida	CST	CST	CST	CST
YJL159W	<i>HSP150</i>	Proteína de choque térmico O-manosilada	119	CST	94	CST
YJL171C		Proteína de función desconocida anclada a la pared celular mediante GPI	CST	CST	CST	CST
YJR004C	<i>SAG1</i>	α-Aglutinina de células α	CST	CST	CST	CST
YJR009C	<i>TDH2</i>	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, isozima 2	CST	CST	CST	CST
YJR150C	<i>DAN1</i>	Manoproteína localizada en la pared celular similar a Tir1p, Tir2p, Tir3p y Tir4p	CST	CST	CST	CST
<b>YKL096W</b>	<b><i>CWP1</i></b>	<b>Manoproteína localizada en la pared celular unida a (1→3)-β y (1→6)-β glucanos por enlace fosfodiéster. Implicada en la organización de la pared</b>	<b>65</b>	<b>139</b>	<b>89</b>	<b>95</b>
<b>YKL096W-A</b>	<b><i>CWP2</i></b>	<b>Manoproteína covalentemente unida a la pared celular. Principal constituyente de la pared, interviene en la estabilización de su estructura</b>	<b>0</b>	<b>242</b>	<b>72</b>	<b>9</b>
YKL163W	<i>PIR3</i>	Proteína O-glicosilada necesaria para la estabilidad de la pared celular	128	86	74	CST
YKL164C	<i>PIR1</i>	Proteína O-glicosilada necesaria para la estabilidad de la pared celular	123	80	76	CST
YKR042W	<i>UTH1</i>	Miembro de la familia SUN localizado en la membrana externa mitocondrial y en la pared celular	CST	CST	CST	CST
YKR102W	<i>FLO10</i>	Proteína tipo lectina similar a Flo1p	CST	CST	CST	CST
YLL024C	<i>SSA2</i>	Proteína de choque térmico de la familia de las HSP70	105	CST	CST	CST
YLR037C	<i>DAN2</i>	Manoproteína localizada en la pared celular similar a Tir1p, Tir2p, Tir3p y Tir4p	CST	CST	CST	CST
YLR040C		Proteína de función desconocida localizada en la pared celular	CST	CST	CST	CST
YLR042C		Proteína de función desconocida localizada en el citoplasma	CST	CST	CST	CST
YLR084C	<i>RAX2</i>	Proteína N-glicosilada implicada en el proceso de gemación bipolar	CST	CST	CST	CST
YLR110C	<i>CCW12</i>	Proteína de pared celular	CST	CST	CST	CST

Tabla 10. Continuación.

ORF	Gen	Descripción del producto génico	(A) Inhibición en mutantes (%)	(B) Regeneración de protoplastos (%)	(C) Capacidad de unión (%)	
					Células	Protoplastos
YLR120C	<i>YPS1</i>	Proteasa de aspártico, anclada a la membrana plasmática mediante GPI	CST	CST	CST	CST
YLR213C	<i>CRR1</i>	Posible glicosido hidrolasa de la pared de la espora	CST	CST	CST	CST
YLR286C	<i>CTS1</i>	Endoquitinasa requerida para la separación celular después de la mitosis	CST	CST	CST	CST
YLR300W	<i>EXG1</i>	Exo-(1→3)-β-glucanasa de la pared celular	CST	CST	CST	CST
YLR307W	<i>CDA1</i>	Quitina deacetilasa	CST	CST	CST	CST
YLR308W	<i>CDA2</i>	Quitina deacetilasa	CST	CST	CST	CST
YLR390W-A	<i>CCW14</i>	Glicoproteína covalentemente unida a la pared celular	85	CST	94	CST
YMR006C	<i>PLB2</i>	Fosfolipasa B implicada en el metabolismo de fosfolípidos	CST	CST	CST	CST
YMR008C	<i>PLB1</i>	Fosfolipasa B implicada en el metabolismo de fosfolípidos	CST	CST	CST	CST
YMR215W	<i>GAS3</i>	Posible (1→3)-β-glucanosil transferasa localizada en la pared celular	92	CST	92	CST
YMR305C	<i>SCW10</i>	Proteína localizada en la pared celular similar a glucanasas	CST	CST	CST	CST
YNL066W	<i>SUN4</i>	Proteína localizada en la pared celular similar a glucanasas	94	CST	98	CST
YNL160W	<i>YGP1</i>	Glicoproteína de secreción relacionada con la pared celular	CST	CST	CST	CST
YNL190W		Proteína localizada en la pared celular de función desconocida	CST	CST	CST	CST
YNL300W		Proteína de pared celular dependiente de GPI	CST	CST	CST	CST
YNL322C	<i>KRE1</i>	Glicoproteína de pared celular implicada en el ensamblaje de los β-glucanos. Receptor de la toxina <i>killer</i> K1 de <i>S. cerevisiae</i>	83	94	34	92
YNL327W	<i>EGT2</i>	Endoglucanasa anclada a la pared celular mediante GPI	CST	CST	CST	CST
YNR044W	<i>AGA1</i>	Subunidad de anclaje de la α-aglutinina de células α	CST	CST	CST	CST
YNR067C	<i>DSE4</i>	Proteína de secreción similar a glucanasas	CST	CST	CST	CST
YOL030W	<i>GAS5</i>	(1→3)-β-glucanosil transferasa localizada en la pared celular	93	CST	87	CST
YOL132W	<i>GAS4</i>	(1→3)-β-glucanosil transferasa localizada en la pared celular	85	CST	92	CST
YOL155C		Manoproteína implicada en la reducción del tamaño de agregados proteicos en vino blanco	CST	CST	CST	CST
YOR009W	<i>TIR4</i>	Manoproteína de pared celular miembro de la familia Srp1p/Tip1p	CST	CST	CST	CST
YOR010C	<i>TIR2</i>	Posible manoproteína de pared celular miembro de la familia Srp1p/Tip1p	CST	CST	CST	CST
YOR190W	<i>SPR1</i>	Exo-(1→3)-β-glucanasa. Contribuye a la termorresistencia de la ascospora	CST	CST	CST	CST
YOR214C		Proteína de función desconocida	CST	CST	CST	CST
YOR242C	<i>SSP2</i>	Proteína localizada en la pared de la espora que interviene en el proceso de esporulación	CST	CST	CST	CST
YOR247W	<i>SRL1</i>	Manoproteína requerida para la estabilidad de la pared celular	CST	CST	CST	CST

Tabla 10. Continuación.

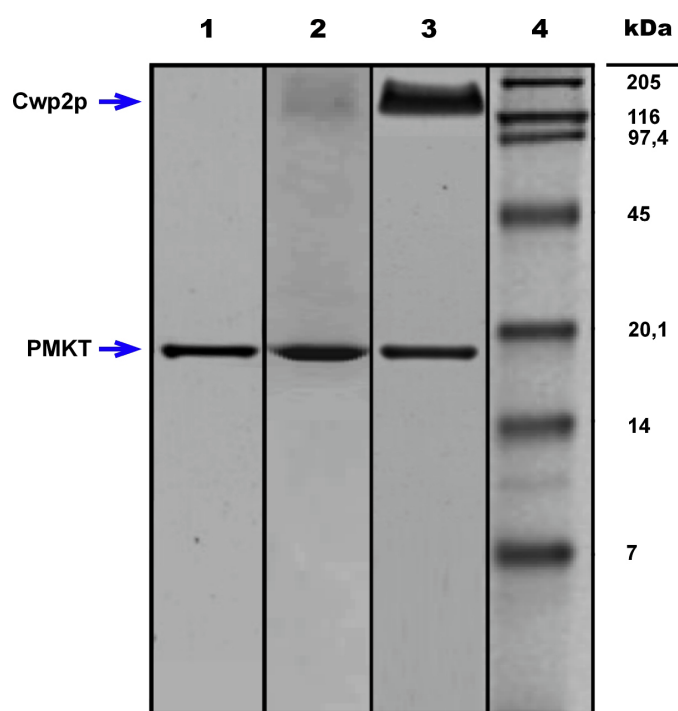
ORF	Gen	Descripción del producto génico	(A) Inhibición en mutantes (%)	(B) Regeneración de protoplastos (%)	(C) Capacidad de unión (%)	
					Células	Protoplastos
YOR382W	<i>FIT2</i>	Manoproteína anclada a la pared celular mediante GPI	CST	CST	CST	CST
YOR383C	<i>FIT3</i>	Manoproteína anclada a la pared celular mediante GPI	CST	CST	CST	CST
YPL130W	<i>SPO19</i>	Proteína específica de meiosis de función desconocida	CST	CST	CST	CST
YPL163C	<i>SVS1</i>	Proteína localizada en la vacuola y la pared celular, implicada en la resistencia a vanadato	105	94	CST	CST
YPR026W	<i>ATH1</i>	Trehalosa ácida requerida para la utilización extracelular de trehalosa	CST	CST	CST	CST

(A) Porcentaje de inhibición obtenido por comparación con la cepa sensible tipo *S. cerevisiae* BY4743: > 100%, más sensible; < 100%, menos sensible; 100%, igual sensibilidad. (B) Porcentaje de regeneración de los protoplastos tratados con toxina obtenido por comparación con protoplastos de la cepa sensible tipo: > 100%, más regeneración; < 100%, menos regeneración; 100%, igual regeneración. (C) Capacidad de unión de las cepas mutantes, células enteras o protoplastos, en relación con la cepa sensible tipo *S. cerevisiae* BY4743: > 100%, mayor unión; < 100%, menor unión; 100%, igual unión. En negrita y de color azul se muestran los 15 mutantes cuyo porcentaje de regeneración tras el tratamiento con PMKT fue mayor que el de la cepa CST. Sombreado en rojo se muestran los mutantes que además tenían su capacidad de unión a la toxina reducida. ABC, *ATP-binding cassette*; AMPc-PAK, proteína quinasa dependiente de AMP cíclico; AP-2, *adaptor-related protein complex 2*; GAP, proteína de activación GTPasa; Rheb, *Ras homolog enriched in brain*; SNARE, *soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor*; t-SNARE, SNARE de membrana plasmática; v-SNARE, SNARE vesicular; CST, cepa sensible tipo.

#### 4.10 Purificación del receptor secundario (Cwp2p) por cromatografía de afinidad

Para purificar el receptor de membrana de PMKT, se inmovilizó la toxina *killer* en una matriz cromatográfica formada por pustulano y sepharosa 6B epoxi-activada que posteriormente se empleó para unir las proteínas procedentes de los extractos de membrana plasmática y pared celular de la cepa sensible tipo y del mutante *cwp2Δ*. Las proteínas unidas a la columna se eluyeron con una solución de glicerol al 15% (v/v) y NaCl 1,5 M en tampón citrato/fosfato 0,01 M a pH 5,0. Aquellas que mostraron actividad (sólo en el caso de la cepa sensible tipo), fueron dializadas y posteriormente resueltas en un gel de poliacrilamida mediante PAGE-SDS (Figura 14).

En las electroforesis (PAGE-SDS) se pudieron observar dos bandas de proteína diferentes, una de aproximadamente 180 kDa y otra con la misma masa molecular que la toxina PMKT (18 kDa; Santos & Marquina, 2004b). Ambas proteínas se detectaron en los eluidos cromatográficos tras aplicar a la columna tanto extractos de membrana plasmática como de pared celular de la cepa sensible tipo. No obstante, la proteína de 180 kDa se detectó con mayor abundancia en las fracciones procedentes de pared celular, lo que podría estar indicando una posible localización preferencial del receptor de la toxina.

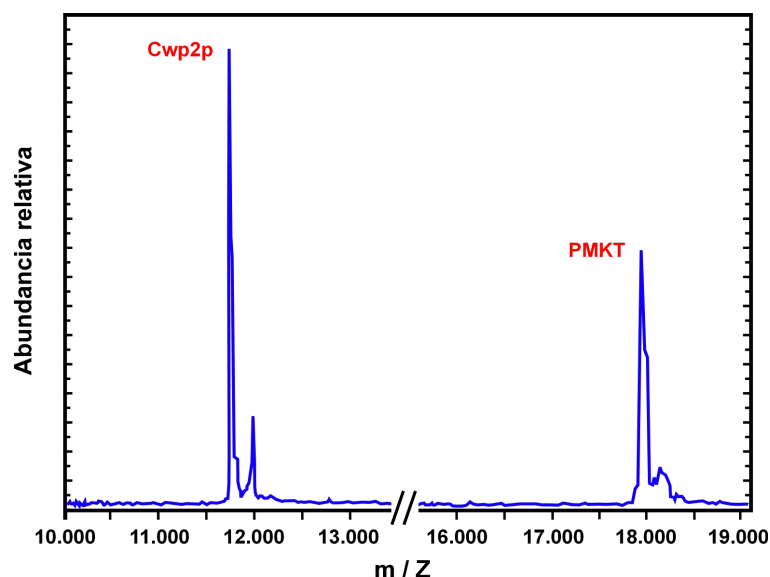


**Figura 14. PAGE-SDS de las fracciones eluidas de la columna de afinidad teñidas con azul Coomassie.** Carril n°1, eluido de proteínas de pared celular procedente del mutante *cwp2Δ*; carril n° 2, eluido de proteínas de membrana plasmática obtenido a partir de la cepa sensible tipo *S. cerevisiae* BY4743; carril n° 3, eluido de proteínas de pared celular obtenido de la cepa sensible tipo; y carril n° 4, patrón proteico de masas moleculares conocidas, que incluye: miosina de músculo de ratón (205 kDa),  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli* (116 kDa), fosforilasa B (97,4 kDa), ovoalbúmina de pollo (45 kDa), inhibidor de tripsina de soja (20,1 kDa),  $\alpha$ -lactoalbúmina (14 kDa), y aprotinina (7 kDa); Sigma.

De forma paralela, las mismas alícuotas eluidas de la cromatografía de afinidad empleadas anteriormente se utilizaron para llevar a cabo un estudio de espectrometría de masas MALDI-TOF, donde se obtuvo un resultado diferente (Figura 15). La banda de 180 kDa observada mediante PAGE-SDS no se detectó, apareciendo en su lugar un único pico de proteína de 11,7 kDa. Para tratar de comprender las diferencias encontradas en la aplicación de las dos técnicas, la banda de proteína de 180 kDa observada mediante PAGE-SDS se extrajo del gel (apartado 3.5) y se utilizó como muestra para la realización de espectrometría MALDI-TOF. Como resultado de este experimento, se detectó un único pico de proteína de 11,7 kDa de masa molecular, confirmándose así la relación directa entre las bandas de 180 kDa y de 11,7 kDa obtenidas mediante el empleo de ambas técnicas. Las diferencias encontradas pudieron deberse a un problema de migración de la proteína en el gel en la realización de la PAGE-SDS. Posiblemente, este problema de migración lenta en el gel, y por ello de sobreestimación de la masa molecular, podría justificarse por el alto grado de glicosidación de la proteína en estudio (van der Vaart *et al.*, 1995).

En el caso del mutante *cwp2Δ*, se utilizaron muestras eluidas de la cromatografía de afinidad tras aplicar a la columna extractos de membrana plasmática y de pared celular para

llevar a cabo un estudio mediante PAGE-SDS con las mismas condiciones descritas anteriormente (Figura 14). Tras revelar el gel, la ausencia de la banda de 180 kDa confirmó que la proteína Cwp2p podría ser considerada como único receptor de la toxina PMKT localizado en la periferia celular.



**Figura 15. Espectrometría de masas MALDI-TOF.** Espectro obtenido mediante MALDI-TOF-MS de las alícuotas activas eluidas de la cromatografía de afinidad compuesta por una matriz de pustulano y sepharosa 6B epoxi-activada unida a la toxina *killer* PMKT. Sólo una proteína de 11,7 kDa, Cwp2p, fue retenida en la columna y posteriormente co-eluida con PMKT (18 kDa).

#### 4.11 Secuenciación del amino terminal del receptor secundario

La secuencia aminoacídica del extremo N-terminal de la proteína co-eluida junto a la toxina PMKT en la cromatografía de afinidad (masa molecular de 11,7 kDa estimada mediante MALDI-TOF-MS) fue: NH<sub>2</sub>-ESAAISQI?DGQIQAT?T?AT?EA?TTAAPSS, existiendo una homología del 100%, sin tener en cuenta los aminoácidos no identificados (?), con la del producto génico del ORF YKL096W-A (*CWP2*) publicado en SGD (Figura 16).

(NH<sub>2</sub>) - MQFSTVASVAFVALANFVAAESAAISQITDGQIQATTTATTEATT  
TAAPSSTVETVSPSSTETISQQTENGAAKAAVGMGAGALAAAAMLL – (COOH)

**Figura 16. Secuencia completa del marco de lectura abierta YKL096W-A.** Subrayado se muestra la secuencia del péptido señal y en azul la parte del amino terminal secuenciada. La correspondencia entre las letras y cada uno de los aminoácidos que integran la cadena polipeptídica viene detallada en el Código aminoacídico.



## 4.12 Estudios de sensibilidad a PMKT en mutantes deficientes en el anclaje de proteínas a las moléculas de GPI

Se realizó un experimento para determinar si los mutantes defectivos en la síntesis de proteínas relacionadas con el sistema de anclaje a la membrana tipo GPI presentaban mayor resistencia a PMKT que la cepa sensible. Los mutantes seleccionados (Tabla 11), células completas y protoplastos, se sometieron a un tratamiento con la toxina *killer* para posteriormente determinar la tasa de inhibición en el crecimiento (células completas) y la tasa de regeneración (protoplastos). Asimismo, se analizó la capacidad de unión de la toxina a cada uno de estos mutantes. En términos generales, la respuesta que se observó fue muy homogénea. El porcentaje de resistencia mostrado fue aproximadamente un 80% más elevado que el de la cepa sensible tipo y en los protoplastos pudo apreciarse un aumento muy significativo de los niveles de viabilidad tras el tratamiento con PMKT. La capacidad de unión de la toxina a células completas y protoplastos se redujo notablemente (Tabla 11).

**Tabla 11.** Actividad de la toxina PMKT frente a mutantes específicos o relacionados con la biosíntesis del sistema de anclaje GPI, células enteras y protoplastos.

Gen (ORF)	Descripción del producto génico	Referencia	(A) Inhibición en mutantes (%)	(B) Regeneración de protoplastos (%)	(C) Capacidad de unión (%)	
					Células	Protoplastos
<i>LAS21</i> (YJL062C)	Proteína integral de membrana plasmática implicada en la síntesis de GPI	Santos <i>et al.</i> (2007)	21	180	30	3
<i>GWT1</i> (YJL091C)	Proteína implicada en la acilación del grupo inositol del GPI	Okamoto <i>et al.</i> (2006)	23	167	34	4
<i>GPI8</i> (YDR331W)	Glicoproteína de la membrana del retículo endoplasmático, subunidad del complejo GPI transamidasa	Fraering <i>et al.</i> (2001)	16	150	29	6
<i>GPI10</i> (YGL142C)	Proteína integral de membrana implicada en el sistema de anclaje GPI	Sütterling <i>et al.</i> (1998)	19	177	22	2
<i>GPI13</i> (YLL031C)	Fosforiltransferasa que añade fosfoetanolamina en el tercer residuo de manosa del precursor del anclaje tipo GPI	Taron <i>et al.</i> (2000)	12	171	24	3
<i>GPI14</i> (YJR013W)	GPI- $\alpha$ 1,4 manosiltransferasa	Davydenko <i>et al.</i> (2005)	19	145	41	5
<i>GPI16</i> (YHR188C)	Proteína transmembrana, subunidad del compleja transamidasa GPI	Fraering <i>et al.</i> (2001)	23	183	34	7
<i>GPI19</i> (YDR437W)	Subunidad de GPI-GlcNAc transferasa	Newman <i>et al.</i> (2005)	19	123	33	4

(A) Porcentaje de inhibición obtenido por comparación con la cepa sensible tipo *S. cerevisiae* BY4743: > 100%, más sensible; < 100%, menos sensible; 100%, igual sensibilidad. (B) Porcentaje de regeneración de los protoplastos tratados con toxina obtenido por comparación con protoplastos de la cepa sensible tipo: > 100%, más regeneración; < 100%, menos regeneración; 100%, igual regeneración. (C) Capacidad de unión de las cepas mutantes, células enteras o protoplastos, en relación con la cepa sensible tipo *S. cerevisiae* BY4743: > 100%, mayor unión; < 100%, menor unión; 100%, igual unión.

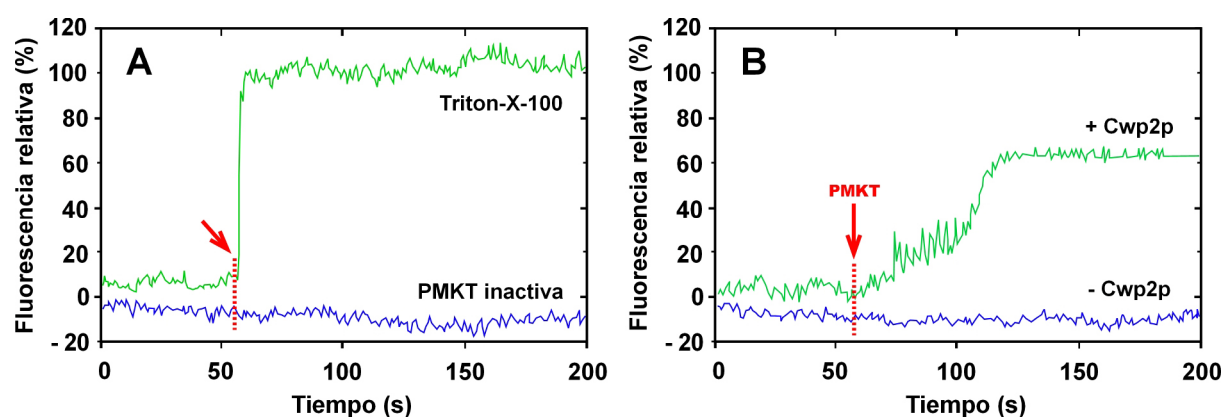
La comparación de la tasa de regeneración y la capacidad de unión de los protoplastos de *S. cerevisiae* Hansen BY4743 con la de los protoplastos pretratados con

fosfolipasa C específica de fosfatidil inositol (PI-PLC) proporcionó resultados muy similares a los mostrados en la tabla 11. Cuando los protoplastos se sometieron al tratamiento con la enzima PI-PLC su sensibilidad a PMKT desapareció casi por completo (reducción en la sensibilidad del 90%) y su capacidad de unión se redujo a cero. Este hecho, pondría de manifiesto que la actividad de la toxina *killer* dependería de la presencia de una proteína con sistema de anclaje tipo GPI localizada en la membrana plasmática.

#### 4.13 Estudio de la sensibilidad a PMKT en liposomas que presentan la proteína Cwp2p incorporada

En el año 2004, los autores Santos & Marquina (2004a) pusieron de manifiesto que la incorporación de PMKT en las bicapas lipídicas de liposomas generaba un patrón de conductancia específico (estudios basados en *Patch Clamp*) que no se observaba en aquellos que, aún siendo pretratados con la toxina, no presentaban la toxina incluida en sus membranas. Esto indicaba que la toxina por si misma era incapaz de interaccionar con la membrana lipídica de forma efectiva.

De este modo, para analizar el papel de la proteína Cwp2p como posible receptor de PMKT se utilizaron liposomas construidos artificialmente con carboxifluoresceína encapsulada en su interior. La capacidad de la toxina para formar canales se determinó valorando la cantidad del fluoróforo liberado al medio extracelular después del tratamiento. Como puede observarse en la figura 17, la exposición a PMKT provocó la salida de carboxifluoresceína sólo cuando los liposomas poseían Cwp2p incorporada en la bicapa lipídica, indicando la implicación de esta proteína en el proceso citotóxico.

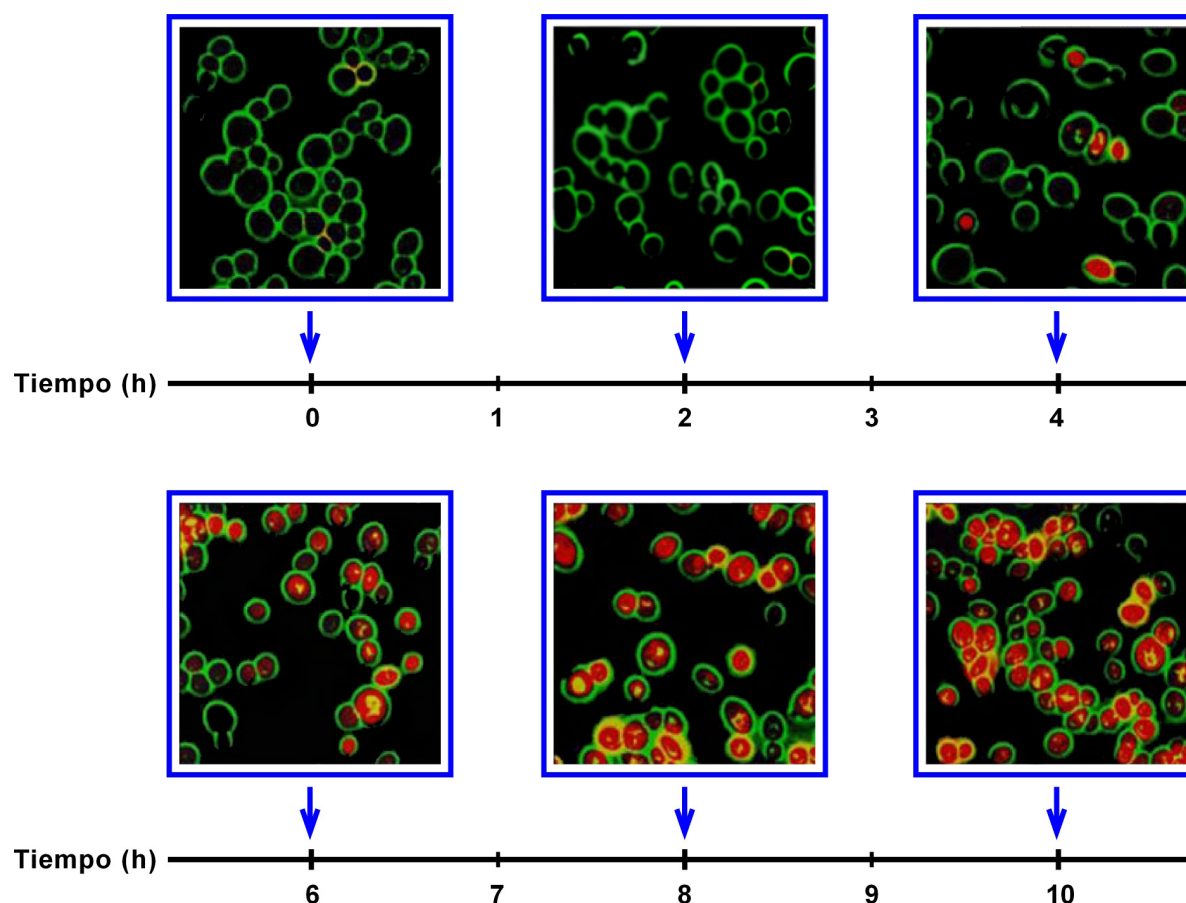


**Figura 17. Proteína Cwp2p como receptor de la toxina PMKT en su mecanismo de acción *killer*.** (A) Liposomas con Cwp2p incluida en la bicapa lipídica tratados con Triton X-100 para medir la cantidad de carboxifluoresceína encapsulada en su interior o con PMKT inactivada (control negativo del experimento). La flecha indica el momento de la adición de ambas sustancias a la suspensión con los liposomas. (B) Capacidad de PMKT para inducir la liberación de carboxifluoresceína en liposomas preparados con y sin Cwp2p. La exposición a PMKT (la flecha indica el momento de la adición) mostró que los liposomas que no poseían Cwp2p incluida en la bicapa lipídica fueron resistentes a la acción de la toxina, mientras que aquellos que si poseían Cwp2p resultaron ser sensibles.

También se utilizó la proteína de fusión GFP-Cwp2p para verificar la incorporación de Cwp2p en los liposomas. Los resultados indicaron que dicha integración fue correcta, comprobándose al mismo tiempo que la fusión de GFP a proteínas presentes en la pared celular puede ser utilizada como una herramienta muy útil para el estudio de la incorporación específica de proteínas en liposomas.

#### 4.14 Localización de Cwp2p en células sensibles y determinación de la viabilidad celular

Se incubaron células sensibles que expresaban la proteína de fusión GFP-Cwp2p con PMKT en presencia de ioduro de propidio para comprobar su viabilidad. Como puede observarse en la figura 18, las células muertas, con marcaje fluorescente del ioduro de propidio en su interior, se detectaron después de 4 horas de tratamiento con la toxina. El 95% de las células se tiñeron completamente tras 8 horas de incubación.



**Figura 18. Localización de la proteína Cwp2p (receptor de PMKT) en la superficie celular.** Microscopía de fluorescencia para el análisis del proceso de muerte celular en células sensible tipo que expresan la proteína de fusión GFP-Cwp2p y que han sido expuestas a la toxina PMKT. La emisión de fluorescencia del ioduro de propidio se detectó a 615 nm. La muerte celular se observó inicialmente tras 4 horas de tratamiento con la toxina y fue completa transcurridas 8-10 horas. De forma paralela, la emisión de fluorescencia a 509 nm de la proteína de fusión GFP-Cwp2p se observó rodeando el citoplasma de las células en todos los tiempos ensayados, confirmando que Cwp2p es una proteína localizada en la periferia celular que está presente durante todo el proceso de intoxicación por la toxina PMKT.

Durante todo el experimento, la señal fluorescente de la proteína de fusión GFP-Cwp2p se observó rodeando el citoplasma de las células, confirmando su localización periférica.

## ***5 DISCUSIÓN***

La supervivencia de un microorganismo en el medio ambiente está fuertemente condicionada por su capacidad de respuesta a las posibles alteraciones de las condiciones del entorno, entre las que se incluyen cambios de pH y temperatura, variaciones del nivel de osmolaridad, modificaciones en la disponibilidad de nutrientes y la presencia o no de elementos responsables de procesos oxidativos. El ambiente intracelular, separado del exterior por la membrana citoplasmática, alberga todo el conjunto de componentes fundamentales para la realización de las funciones básicas, es decir, el desarrollo y la multiplicación de la célula. Sin embargo, aunque la membrana citoplasmática constituye una barrera encargada de los intercambios específicos con el exterior y la pared celular contribuye a la protección osmótica y física de la célula, ambas no aseguran una protección suficiente frente al entorno.

Muchos de los mecanismos que intervienen en el proceso de adaptación a situaciones específicas de estrés se han puesto de manifiesto mediante el estudio de la respuesta transcripcional global (Craig, 1992; Blomberg, 1995; Alexandre *et al.*, 2001; Causton *et al.*, 2001; García *et al.*, 2004; Dardalhon *et al.*, 2007; Rossignol *et al.*, 2007). El análisis de dicha respuesta transcripcional en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* al tratamiento con la toxina PMKT se llevó a cabo mediante el empleo de *microarrays* de ADN, una técnica habitualmente utilizada durante los últimos años en levaduras y otros microorganismos para estudiar la respuesta a agentes físicos y químicos (antifúngicos, quimioterápicos, xenobióticos y diferentes tipos de estrés ambiental) (Blomberg, 1995; Zhang *et al.*, 1997; Gasch *et al.*, 2000; Alexandre *et al.*, 2001; Causton *et al.*, 2001; García *et al.*, 2004; Dardalhon *et al.*, 2007; Rossignol *et al.*, 2007). Tras la normalización de los datos, la validación de los resultados obtenidos en estos *arrays* se hizo mediante Q-RT-PCR, con mayor sensibilidad para la detección y cuantificación de todos aquellos genes estudiados cuya expresión varió sustancialmente, e incluso aquellos transcritos de ARNm con niveles variables de expresión o difíciles de interpretar (Bustin, 2000; Yun *et al.*, 2006; Su *et al.*, 2007). Este análisis de la respuesta génica a PMKT se llevó a cabo teniendo en cuenta que, después de la unión de la toxina a sus receptores de pared celular [(1→6)-β-glucanos] (Santos *et al.*, 2000), la muerte celular no se produce hasta casi una hora después. Esta fase de latencia observada, donde la viabilidad de la célula sensible se ve comprometida y la maquinaria celular se redirige a contrarrestar los efectos nocivos de la toxina, podría implicar los siguientes procesos: adhesión de la toxina a su receptor secundario, denominado Cwp2p, caracterizado en el presente trabajo y localizado en la membrana plasmática y pared celular; formación de canales iónicos en la membrana plasmática (Santos & Marquina, 2004a); cambios metabólicos y transcripcionales, tales como la alteración del gradiente

electroquímico transmembrana (Santos & Marquina, 2004b) o la inducción de elementos implicados en la respuesta a estrés; y por último, formación de poros debidos a la pérdida de la integridad de la membrana plasmática, capaces de permitir el paso de moléculas de alto peso molecular, de forma secuencial a la formación de los canales iónicos (Kagan, 1983; Kurzweilová & Sigler, 1994; Santos & Marquina, 2004a).

### 5.1 Correlación con respuestas a estrés ya conocidas en levaduras

Los genes que se regularon positivamente tras el tratamiento de la levadura sensible con la toxina PMKT (Tabla 8) se compararon con genes que se inducen en respuesta distintos tipos de estrés descritos por otros grupos de investigación. Con algunas excepciones, se pudo establecer una gran correlación con el patrón de genes implicados en la respuesta a estrés osmótico (Rep *et al.*, 2000) y, en menor medida, con el de genes inducidos en respuesta al tratamiento de *S. cerevisiae* con antibióticos poliénicos como la anfotericina B y la nistatina (Zhang *et al.*, 2002; Agarwal *et al.*, 2003). Así, genes como *CTT1*, *HSP12*, *GPD1*, *GPP2*, *TRK2*, *PDR12*, *ENA1*, *YAP1*, *XBP1*, *SCH9*, *HAL9* y *STL1*, relacionados directamente con el estrés celular o la tolerancia a la sal, se indujeron en presencia de la toxina. Este hecho podría indicar que la respuesta celular a la acción de PMKT podría estar fundamentalmente basada en la expresión de genes que codifican proteínas implicadas en la respuesta a estrés osmótico.

Sin embargo, un análisis detallado de la respuesta transcripcional a PMKT reveló también la existencia de ciertas divergencias con otras respuestas transcripcionales descritas. Bajo determinadas condiciones de estrés ambiental (temperatura, osmolaridad, acidez del medio...) o en el tratamiento con ciertos antibióticos poliénicos, es frecuente observar una reducción de los niveles de expresión de algunas proteínas ribosomales como parte del programa de respuesta celular (Jelinsky & Samson, 1999; Gasch *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2002; Becerra *et al.*, 2003). Se piensa que esta reducción podría estar implicada en el mantenimiento de los niveles basales de la síntesis proteica y de utilización de energía con el fin de redirigir la maquinaria celular al incremento de la expresión de genes capaces de responder a esas condiciones adversas de forma adecuada. En el caso de la respuesta génica a la toxina PMKT, ni los niveles de expresión de genes de proteínas ribosómicas mitocondriales ni los de proteínas ribosómicas nucleares se redujeron significativamente (Tabla 9). Este hecho se debería tener en cuenta a la hora de determinar el mecanismo de acción de la toxina, pues tales diferencias con los tipos de estrés descritos anteriormente podrían indicar la participación de diversos mecanismos de respuesta dependiendo del estrés implicado en cada caso (toxinas, antibióticos, metales pesados,

radiaciones, etc.). Asimismo, estas discrepancias podrían posiblemente ser atribuidas a distintas observaciones en el tiempo de dos procesos que pueden ser, en un principio, similares. Este hecho queda justificado porque de forma general las respuestas rápidas a estrés implican la activación de rutas de señalización que modulan la función de proteínas pre-existentes (metabolismo, transporte de membrana, etc.) o que inducen cambios en la expresión génica (biosíntesis de nucleótidos y proteínas) que constituyen la base de la respuesta tardía. Las respuestas tardías incluyen actividades de transporte de proteínas y metabolitos intracelulares donde se incrementa el consumo de energía para el mantenimiento de la homeostasis celular (Schuller *et al.*, 1994).

### 5.1.1 Respuesta celular para el mantenimiento de la homeostasis iónica

Los trabajos de investigación llevados a cabo por Causton *et al.* (2001) sugirieron que el mantenimiento de la homeostasis iónica se establece en la célula como un patrón de respuesta común frente a la mayoría de las alteraciones producidas en el medio ambiente. En base a los resultados obtenidos se pudo determinar que muchos de los genes inducidos durante la respuesta celular a la acción de la toxina PMKT codificaron para distintos tipos de proteínas transportadoras, o alguno de sus componentes y subunidades reguladoras, implicadas todas ellas en el mantenimiento de la homeostasis a través de la movilización de iones, azúcares, aminoácidos y otros metabolitos (Tabla 8). De todas ellas, cabe destacar la regulación positiva de algunos transcritos que codifican para transportadores de iones implicados en la detoxificación de sodio (Mendoza *et al.*, 1996; Nelissen *et al.*, 1997) y en el mantenimiento de los niveles citoplasmáticos de potasio (Ko & Gaber, 1991; Ketchum *et al.*, 1995). Ya se ha comentado que la alteración de la permeabilidad de la membrana plasmática en las células sensibles responde al mecanismo de acción específico de algunas toxinas *killer* como, por ejemplo, las toxinas K1 y K2 de *S. cerevisiae*, la zigocina producida por *Zygosaccharomyces bailii*, la toxina *killer* de *Schwanniomyces occidentalis* o la toxina PMKT (Kagan, 1983; Martinac *et al.*, 1990; Tipper & Schmitt, 1991; Chen *et al.*, 2000; Breinig *et al.*, 2002; Weiler & Schmitt, 2003; Santos & Marquina, 2004a). De este modo, la pérdida de iones y nutrientes de bajo peso molecular a través de canales no regulados podría originar un incremento en la expresión de genes de transportadores transmembrana tales como *ENA1*, *TRK2*, *PHO89*, *ZRT1* y *PDR12*; permitiendo así una eficiente movilización de nutrientes e iones para compensar las pérdidas ocasionadas por la acción de la toxina PMKT en los primeros momentos de la acción citotóxica (Santos & Marquina, 2004a).

En condiciones normales, los niveles de salinidad del medio extracelular permiten a las levaduras incorporar pequeñas concentraciones de sodio ( $\text{Na}^+$ ) que resultan suficientes



para su intervención en el metabolismo de macromoléculas específicas (Page & Di Cera, 2006). El incremento de estos niveles extracelulares de  $\text{Na}^+$  puede resultar tóxico para las células, principalmente por dos razones: primero, porque originan un desequilibrio en el potencial osmótico que conlleva pérdidas de agua intracelular; y segundo, porque la entrada de sodio en la célula puede causar el bloqueo de múltiples rutas metabólicas (Murguía *et al.*, 1996; Serrano *et al.*, 1999; Hasegawa *et al.*, 2000). En levaduras existen varios sistemas transportadores de sodio que provocan su salida continuada de la célula y mantienen concentraciones muy bajas de este catión en el citosol (Figura 19) (Rodríguez-Navarro & Ortega, 1982). En el caso de *S. cerevisiae*, los tres sistemas de transporte principales implicados en este proceso de detoxificación de sodio están codificados por el gen *NHX1* (Nass *et al.*, 1997), el gen *NHA1* (Prior *et al.*, 1996) y genes miembros de la familia *ENA* (Wieland *et al.*, 1995), respectivamente; habiéndose comprobado que la ausencia de todos ellos provoca alteraciones severas en la homeostasis iónica que conduce a la despolarización de la membrana plasmática (Kinclova-Zimmermannova *et al.*, 2006).

El primero de estos transportadores, Nhx1p, es un intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  que se localiza en las membranas de las vacuolas y los endosomas (Figura 19) (Nass & Rao, 1998). Inicialmente los estudios realizados condujeron a determinar que los flujos de salida y entrada (acumulación) de  $\text{Na}^+$  en el interior de la vacuola, regulados por Nhx1p, están implicados en la respuesta a estrés salino e hiperosmótico (Nass *et al.*, 1997; Nass & Rao, 1999). Más tarde se comprobó su participación en otros procesos, como son: el mantenimiento de la homeostasis del pH citoplasmático junto a la acción de otros transportadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  situados en la membrana plasmática (Brett *et al.*, 2005), la regulación del pH endosomal como parte importante del mecanismo de control del transporte vesicular (van Weert *et al.*, 1997; Ali *et al.*, 2004), y, de forma similar al intercambio  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , la capacidad de transportar  $\text{K}^+$  al interior de vacuolas actuando como sistema detoxificador frente a altas concentraciones de KCl (Brett *et al.*, 2005). Como resultado del estudio de la respuesta al efecto de la toxina PMKT, se pudo determinar que la expresión del gen *NHX1* no se ve modificada de forma apreciable, indicando que este sistema detoxificador no se haya implicado en la respuesta a la toxina, al menos a nivel transcripcional. El hecho de que este transportador se encuentre localizado a nivel vacuolar, permitiría sugerir que su implicación en la respuesta a PMKT pudiera acontecer en estadios más avanzados de la acción citotóxica o producirse únicamente a nivel postraduccional.

El segundo sistema, Nha1p, es un intercambiador  $\text{Na}^+-\text{K}^+/\text{H}^+$  que se localiza en la membrana plasmática de la levadura (Figura 19) (Bañuelos *et al.*, 1998). Se ha descrito que es capaz de aprovechar la fuerza protón-motriz originada por la ATPasa Pma1p para mediar la expulsión de cationes  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Li}^+$  (Sychrova *et al.*, 1999), teniendo un importante

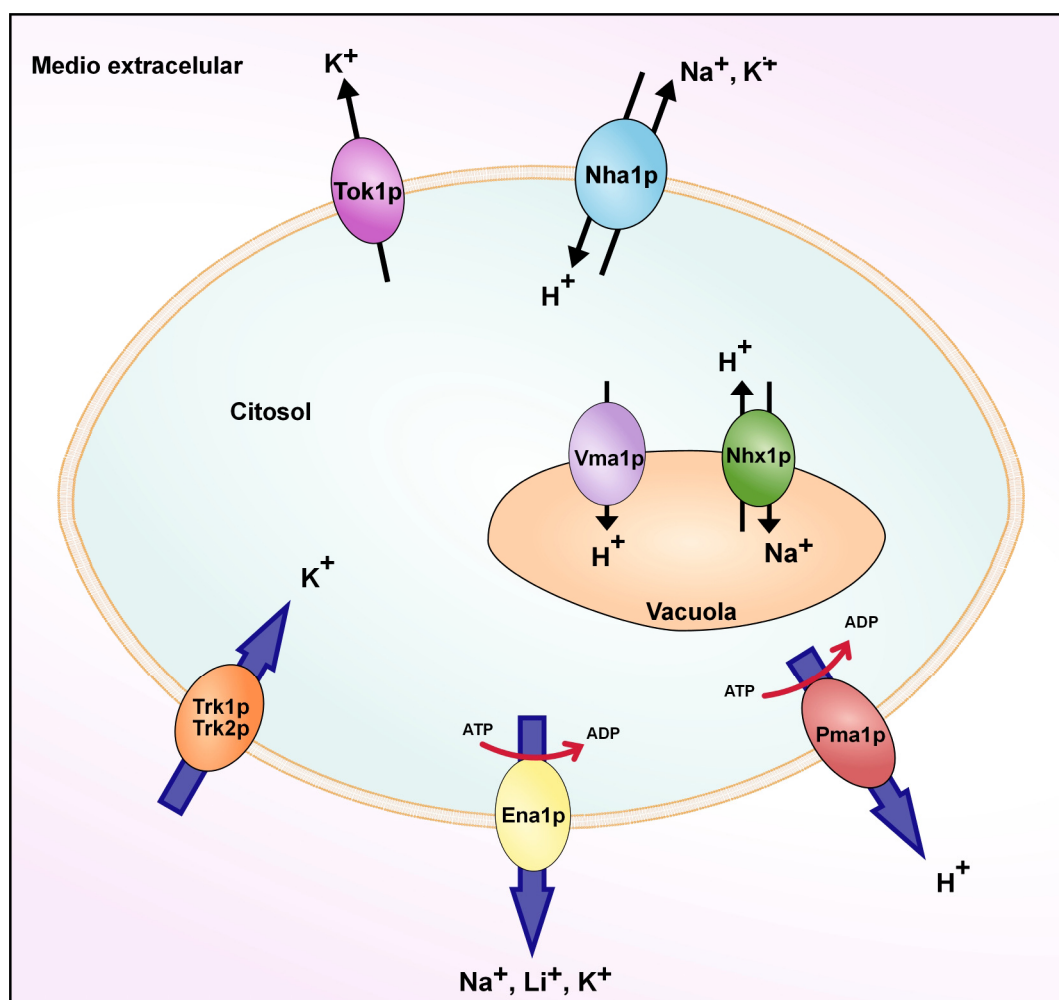
significado biológico sobre todo en el mantenimiento del pH intracelular en medios ácidos (Prior *et al.*, 1996; Bañuelos *et al.*, 1998). En respuesta a la toxina PMKT, los niveles de expresión de *NHA1* se vieron incrementados aproximadamente diez veces. Nha1p interviene principalmente en la respuesta inmediata a estrés hiperosmótico a través de la regulación de su actividad antiporte de  $K^+$  por la MAPK Hog1p (Kinclova-Zimmermannova & Sychrova, 2006). Además, es conocido que Nha1p contribuye a la resistencia en ambientes salinos de forma moderada (Sychrova *et al.*, 1999; Mitsui *et al.*, 2004), lo cual justificaría la diferencia sustancial de sobreexpresión observada entre dicho transportador y ENA1 (Tabla 8), que como se comenta posteriormente juega un papel más importante en la detoxificación de sodio (Haro *et al.*, 1991; Benito *et al.* 2002).

El tercer sistema de transporte, codificado por los genes *ENA*, es una subfamilia de ATPasas tipo P situadas en la membrana plasmática con diferentes capacidades para provocar la extrusión celular de cationes  $Na^+$ ,  $K^+$  y  $Li^+$  en contra de gradiente electroquímico mediante la hidrólisis de ATP (Figura 19) (Catty *et al.*, 1997; Benito *et al.*, 2002). Se han identificado cinco tipos de genes *ENA* diferentes, *ENA1-ENA5*, que aparecen en distinto número de copias organizadas en *clusters* específicos dependiendo de la cepa de *S. cerevisiae* que se trate (Haro *et al.*, 1991; Martínez *et al.*, 1991; Garciadeblas *et al.*, 1993; Wieland *et al.*, 1995). De ellos, *ENA1/PMR2* ha sido el que más extensamente se ha estudiado a lo largo de los años y el que constituye el principal sistema detoxificador de  $Na^+$  y  $Li^+$  en *S. cerevisiae* (Haro *et al.*, 1991; Benito *et al.* 2002). En condiciones normales, su nivel de expresión basal se mantiene bajo al igual que el de los otros miembros del *cluster* (Ghaemmaghami *et al.*, 2003), pero ha resultado ser el único rápidamente inducido en respuesta a altas concentraciones de  $Na^+$  o  $Li^+$  o la alcalinización del pH del medio extracelular (Garcia deblas *et al.*, 1993; Mendoza *et al.*, 1994; Posas *et al.*, 1995; Wieland *et al.*, 1995). El estudio de la expresión de *ENA1/PMR2* ha revelado un complejo sistema de regulación transcripcional donde intervienen, generalmente de forma independiente, diferentes rutas metabólicas (Ruiz & Ariño, 2007), destacando: la ruta HOG (Márquez & Serrano, 1996), la ruta de la calcineurina (Márquez & Serrano, 1996), la ruta de las quinasas Tor (Crespo *et al.*, 2001), la ruta del factor transcripcional *RIM101* (Serrano *et al.*, 2002), la represión por glucosa (Alepuz *et al.*, 1997) y el sistema *HAL3/PPZ* (Ruiz *et al.*, 2003). De todas ellas, las tres primeras parecen ser principalmente responsables de la inducción del gen *ENA1* en respuesta a posibles alteraciones en los niveles de salinidad del medio extracelular (Márquez & Serrano, 1996; Platara *et al.*, 2006). En presencia de bajas concentraciones de NaCl, la inducción de *ENA1/PMR2* ante el estrés osmótico generado depende de la activación de la ruta HOG, en la que la transmisión de la señal culmina con la fosforilación del extremo N-terminal de Sko1p y la consecuente liberación del complejo

proteico (Sko1p-Ssn6p-Tup1p) que actúa como represor del gen (Proft *et al.*, 2001). Por el contrario, en condiciones de alta salinidad el incremento de los niveles de expresión de *ENA1/PMR2* está mediado principalmente por la actividad de una fosfatasa dependiente de calcio/calmodulina denominada calcineurina (Mendoza *et al.*, 1994; Ferrigno *et al.*, 1998; Pardo *et al.*, 1998; Rep *et al.*, 1999; Heath *et al.*, 2004), que responde generalmente a situaciones de estrés en un ambiente iónico (Yale & Bohnert, 2001). La calcineurina es una enzima heterodimérica que consta de una subunidad catalítica (CNA) y una subunidad reguladora (CNB) (Cyert *et al.*, 1991). La exposición de células a altas concentraciones de NaCl o pH elevados provoca un aumento significativo del nivel citosólico de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) que favorece la unión de cuatro moléculas del catión a CNB, estimulándose parcialmente la actividad fosfatasa del complejo CNA-CNB. La subunidad CNA es a su vez capaz de unirse a otros complejos de  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina, constituyéndose un heterotrímero que representa el estado completamente activo de la calcineurina (Cyert *et al.*, 1991; Denis & Cyert, 2002; Viladevall *et al.*, 2004). Una vez activa, interviene en la regulación positiva de más de 150 genes (Yoshimoto *et al.*, 2002). La activación de *ENA1/PMR2* se produce mediante la defosforilación y entrada en el núcleo del factor de transcripción Crz1/Tcn1/Hal8 (Matheos *et al.*, 1997; Stathopoulos & Cyert, 1997; Mendizabal *et al.*, 1998), que se unirá a dos secuencias específicas del promotor de *ENA1* y mediará su transcripción (Mendizabal *et al.*, 2001). En estos ambientes de alta salinidad, la inhibición de la ruta de señalización TOR, que en condiciones normales impide la entrada al núcleo del factor de transcripción Gln3/Gat1 y su interacción con el promotor de *ENA1* (Crespo *et al.*, 2001), y la actividad del complejo histona deacetilasa Rpd3-Sin3 (de Nadal *et al.*, 2004), activada por Hog1p (ruta HOG), resultan ser mecanismos complementarios al efecto de la calmodulina en el aumento de la expresión del gen.

El tratamiento de la levadura sensible con la toxina PMKT provocó un incremento de los niveles de expresión de *ENA1*, con una tasa de inducción de aproximadamente 30 veces su nivel basal (Tabla 8). Relacionado con este gen, se detectó también un aumento significativo del nivel de expresión del transcrito *HAL9*. Se trata de un factor de transcripción que, en alto número de copias y a través de un mecanismo de regulación que aún no se conoce con exactitud, provoca la activación de *ENA1* confiriendo un incremento de la tolerancia a altas concentraciones de  $\text{Na}^+$  o  $\text{Li}^+$  (Mendizabal *et al.*, 1998). Además, el gen *PSR1* se reguló positivamente en presencia de la toxina PMKT. Este gen codifica para una fosfatasa de membrana plasmática implicada también en la respuesta a estrés por sodio a través de la activación transcripcional de *ENA1/PMR2* (Siniosoglou *et al.*, 2000) y que es requerida para la activación completa de la respuesta general a estrés (Kaida *et al.*, 2002). Los mutantes de delección para cada uno de esos genes (*ENA1*, *HAL9* y *PSR1*) mostraron

una elevada sensibilidad a PMKT (Tabla 8), indicando su gran implicación a nivel global para contrarrestar los efectos citotóxicos generados por la toxina. En el caso del mutante *Ena1Δ*, el aumento de sensibilidad mostrado con respecto a la cepa sensible tipo fue aproximadamente del 160%.



**Figura 19.** Principales sistemas de transporte implicados en la homeostasis de iones monovalentes en *S. cerevisiae*. Con respecto a los transportadores relacionados con la detoxificación de  $Na^+$ , en la membrana plasmática de la levadura se localizan Ena1p, que provoca la extrusión celular de cationes  $Na^+$ ,  $K^+$  y  $Li^+$  en contra de gradiente electroquímico mediante la hidrólisis de ATP, y Nha1p, un intercambiador  $Na^+-K^+/H^+$  que aprovecha la fuerza protón-motriz originada por la ATPasa Pma1p para mediar la expulsión de cationes  $Na^+$ ,  $K^+$  y  $Li^+$ . En la membrana de la vacuola se encuentra el intercambiador de  $Na^+/H^+$  Nhx1p, que en respuesta a estrés salino e hiperosmótico introduce  $Na^+$  en el interior de la vacuola acoplado este transporte al gradiente de protones generado por la actividad de la ATPasa Vma1p (Nass & Rao, 1998; Quintero *et al.*, 2000). Con respecto a los transportadores implicados en el mantenimiento de los niveles intracelulares de  $K^+$ , en la membrana plasmática de la levadura cabe destacar la presencia de Tok1p, un transportador pasivo regulado por el estado de polarización de la membrana plasmática (voltaje-dependiente) y por el nivel de  $K^+$  extracelular, y el sistema de permeasas Trk1p/Trk2p, principal vía de entrada del catión al citosol (transporte activo dependiente del potencial de membrana generado por Pma1p).

De todos los cationes que son transportados a través de la membrana plasmática para lograr el mantenimiento de la homeostasis iónica ( $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $H^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $NH_4^+$ , etc.), el potasio ( $K^+$ ) es el que presenta el mayor nivel de prevalencia en el citosol (Borst-Pawels, 1981). Una parte de estos niveles es regulada por algunos de los sistemas que intervienen en la detoxificación de  $Na^+$  (Bañuelos *et al.*, 1998; Benito *et al.*, 2002; Brett *et al.*,

2005), sobre todo por actividad de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  codificada por *ENA1-4*, mientras que otra parte implica la actuación de proteínas transportadoras diferentes (Figura 19), donde se incluye: el transporte acoplado de  $\text{K}^+$  (antiporte) a la actividad de la protón-ATPasa de membrana Pma1p, que en condiciones normales facilita la salida de  $\text{H}^+$  al medio extracelular (Serrano, 1984), el transporte pasivo de  $\text{K}^+$  a través de canales iónicos transmembrana voltaje-dependientes (Gustin *et al.*, 1986) y el transporte activo a través de un sistema de permeasas que media la internalización de  $\text{K}^+$  dependiendo de su grado de afinidad por el catión (Rodríguez-Navarro & Ramos, 1984).

Las ATPasas transportadoras de  $\text{H}^+$  suponen aproximadamente el 50% de la cantidad de proteínas totales localizadas en la membrana plasmática de *S. cerevisiae* (Serrano, 1989). *PMA1* es el gen que codifica el sistema protón-ATPasa más importante en esta levadura (Serrano *et al.*, 1986), que genera un gradiente electroquímico de protones (potencial de membrana) que resulta esencial para la internalización activa de nutrientes y para la regulación del pH intracelular (Goffeau & Slayman, 1981; Ambesi *et al.*, 2000). El acoplamiento del flujo de entrada de  $\text{K}^+$  al de salida de  $\text{H}^+$  contribuye a mejorar la homeostasis iónica, pues reduce el potencial de membrana generado por Pma1 evitando la entrada de cationes tóxicos (ej.,  $\text{Na}^+$  y  $\text{Li}^+$ ) a través de transportadores inespecíficos de baja afinidad. Este transporte acoplado está también implicado en la regulación del equilibrio de cargas a través de la membrana en condiciones de estrés ácido (Macpherson *et al.*, 1995). Asimismo, se ha comprobado que los niveles de expresión de *PMA1* están fuertemente condicionados por la presencia de glucosa en el medio de cultivo y su metabolismo (Serrano, 1983; García-Arranz *et al.*, 1994; Estrada *et al.*, 1996; Portillo, 2000) y por el ciclo celular (Kuo & Grayhack, 1994).

La expresión de *PMA1* se redujo de forma moderada tras el tratamiento con la toxina PMKT (Tabla 9). En estudios previos, se determinó que la actividad de la toxina genera un cambio sustancial en la homeostasis celular debido a una acidificación citosólica y a la desregulación de los flujos de entrada y salida de iones (Santos & Marquina, 2004a). De forma contraria a lo que cabría esperar, estos cambios producidos en la célula sensible deberían inducir aumentos en el nivel de expresión de *PMA1* para contrarrestar el efecto citotóxico de la toxina, fundamentalmente en lo que se refiere a la acidificación intracelular. Sin embargo, teniendo en cuenta que las ATPasas transportadoras de  $\text{H}^+$  suponen, como se ha comentado anteriormente, el 50% de la cantidad de proteína total localizada en la membrana plasmática, podría suponerse que la presencia de estos transportadores está presente en la célula en cantidad suficiente como para justificar una mayor transcripción. El hecho de que los mutantes de delección para dicho gen *PMA1* fuesen más resistentes a la acción de PMKT (Tabla 8) y que, según está descrito, los mutantes de delección para la

ATPasa tipo P Spf1 presentan también resistencia a la toxina *killer* de *P. farinosa* (Suzuki & Shimma, 1999), podría suponer la existencia de mecanismos adicionales a los meramente implicados en la homeostasis del pH y que justificasen esa disminución de su expresión.

Con respecto a los canales iónicos transmembrana que funcionan como transportadores pasivos de  $K^+$ , en *S. cerevisiae* cabe destacar la existencia de Tok1p (Figura 19) (Gustin *et al.*, 1986; Ketchum *et al.*, 1995; Reid *et al.*, 1996). Se trata de una proteína con dos dominios canal tipo P dispuestos en tándem (Ketchum *et al.*, 1995; Loukin & Saimi, 2002), comúnmente encontrados en todos los canales iónicos que intervienen en el transporte selectivo de  $K^+$ , que está regulada por el estado de polarización de la membrana plasmática (voltaje-dependiente) y por el nivel de  $K^+$  extracelular (Johansson & Blatt, 2006). De este modo, la activación y apertura de cualquiera de los dos dominios canal (o ambos simultáneamente) que implica la liberación de  $K^+$  al medio extracelular se produce al despolarizarse la membrana en condiciones específicas (Zhou *et al.*, 1995; Fairman *et al.*, 1999), mientras que el incremento de la concentración extracelular del catión provoca el cierre del canal (Lesage *et al.*, 1996; Vergani *et al.*, 1997). Actualmente, la función fisiológica del canal Tok1p en *S. cerevisiae* se desconoce, pero podría jugar un papel importante durante la respuesta a estrés osmótico al ser regulado positivamente por la acción de la proteína Hog1p fosforilada (ruta HOG; Proft & Struhl, 2004). Inicialmente, la apertura de los canales Tok1p se relacionó de forma directa con el efecto *killer* de la toxina K1 de *S. cerevisiae* (Ahmed *et al.*, 1999). Sin embargo, investigaciones posteriores han determinado que esa activación y apertura de los canales es consecuencia de un efecto secundario de la toxina y posiblemente no contribuye de forma significativa al efecto letal específico desarrollado por esta (apartado 1.4.1) (Breinig *et al.*, 2002; Bertl *et al.*, 2003; Pagé *et al.*, 2003). En ciertas condiciones específicas (células hiperpolarizadas y energizadas), se sabe que Tok1p puede actuar internalizando  $K^+$  (Fairman *et al.*, 1999). *TOK1* presentó un aumento moderado de su expresión en respuesta a PMKT. Este aumento de su expresión podría ir encaminado a incrementar la velocidad de transporte de potasio al interior celular para compensar en parte algunas de las pérdidas ocasionadas por la actividad de la toxina. En cualquier caso, la capacidad de internalización o liberación de  $K^+$  mediada por Tok1p sería enmascarada por el flujo neto de entrada de  $K^+$  aportado por los transportadores Trk1 y Trk2, por lo que la contribución fisiológica de Tok1p en respuesta a las alteraciones de la homeostasis iónica mediada por la toxina podría ser despreciable. De hecho, de forma experimental, para poder poner de manifiesto la aportación de Tok1p en levaduras es necesaria la sobreexpresión de dicho transportador y la delección simultánea de *TRK1* y *TRK2* (Fairman *et al.*, 1999). El mutante de delección carente del gen *TOK1* presentó una sensibilidad a la toxina muy parecida a la cepa sensible tipo, por lo que quedaría una vez

más justificado el hecho de que este transportador contribuye escasamente a contrarrestar los efectos citotóxicos generados por PMKT.

En cuanto al transporte activo de  $K^+$  mediado por permeasas, las proteínas Trk1p y Trk2p constituyen el principal sistema de entrada del catión al citosol (Figura 19). Inicialmente se demostró el funcionamiento de cada una de ellas como unidades transportadoras independientes que presentaban diferente grado de afinidad por  $K^+$  (Ko *et al.*, 1990; Ko & Gaber, 1991; Gaber, 1992). Sin embargo, más tarde se planteó una nueva hipótesis que integraba ambas proteínas en un mismo sistema que, junto a otra u otras proteínas, permitía el transporte de este catión al interior celular consumiendo gran parte del potencial de membrana generado por la ATPasa Pma1p (Gaber *et al.*, 1988; Ramos *et al.*, 1994). La mayoría de los estudios llevados a cabo han revelado que la regulación de este transporte de  $K^+$  mediado por Trk1p y Trk2p resulta ser muy compleja. Aparentemente, ambos transportadores parecen poseer un sitio de unión específico para  $K^+$  y un segundo sitio de unión capaz de alojar una gran diversidad de cationes diferentes ( $K^+$ ;  $Na^+$ ,  $H^+$ , etc.) dependiendo de su disponibilidad en el medio extracelular (Armstrong & Rothstein, 1967; Haro & Rodríguez-Navarro, 2002), estableciéndose un transporte de tipo simporte a través de la membrana plasmática que es capaz de concentrar grandes cantidades de  $K^+$  en contra de su gradiente electroquímico (Ko & Gaber, 1991; Haro *et al.*, 1999). La caracterización de los flujos de entrada y salida de otros iones ( $H^+$ ,  $Na^+$ ,  $Cl^-$ ,  $Ca^{2+}$ , etc.), supuestamente dependientes de este sistema TRK, le han atribuido nuevas propiedades y funciones fisiológicas adicionales (Bihler *et al.*, 1999; Kuroda *et al.*, 2004; Rivetta *et al.*, 2005). Trk1p es un transportador de alta afinidad para  $K^+$  (Ramos *et al.*, 1985; Gaber *et al.*, 1988; Ko & Gaber, 1991), mientras que Trk2p parece ser un transportador de afinidad moderada (Ramos *et al.*, 1994). Ambas proteínas presentan dominios tipo P en su estructura y comparten una homología del 55% en su secuencia aminoacídica (Ko & Gaber, 1991; Haro & Rodríguez-Navarro, 2003; Zheng *et al.*, 2004). Aunque la contribución al mantenimiento de la homeostasis iónica de  $K^+$  en respuesta a los niveles del catión en el citosol o al pH intracelular resulta ser aparentemente mayor en el caso de Trk1p (Rodríguez-Navarro & Ramos, 1984; Ramos & Rodríguez-Navarro, 1986; Ramos *et al.*, 1990), la diferencia encontrada con respecto a la menor implicación de Trk2p podría explicarse como consecuencia de su bajo nivel de expresión (Ramos *et al.*, 1994; Bihler *et al.*, 1999). Diversos estudios han demostrado que el mutante de delección *trk1Δ* es incapaz de crecer en condiciones de baja disponibilidad de  $K^+$  debido a una reducción significativa en el transporte del catión (Ramos *et al.*, 1985; Gaber *et al.*, 1988; Ko & Gaber, 1991), siendo este fenotipo más acusado en el caso del doble mutante *trk1Δ trk2Δ* (Ko *et al.*, 1990; Ramos *et al.*, 1994) en el cual además se ha comprobado un incremento en la sensibilidad a iones  $Na^+$

y  $\text{Li}^+$  (Haro *et al.*, 1993; Gómez *et al.*, 1994; Mendoza *et al.*, 1994; Bertl *et al.*, 2003) y una hiperpolarización de la membrana plasmática (Madrid *et al.*, 1998). En presencia de altas concentraciones de  $\text{Na}^+$  en el medio extracelular, el sistema TRK, que en condiciones normales también permite la entrada de este catión en el citosol, incrementa su afinidad por  $\text{K}^+$  para controlar la entrada de  $\text{Na}^+$  y evitar así posibles procesos de intoxicación (Haro *et al.*, 1993; Gómez *et al.*, 1996). Esta activación del sistema TRK en respuesta a estrés por sodio es regulada de forma positiva a nivel postranscripcional por la acción específica de la fosfatasa calcineurina, estando implicada de forma directa o indirecta en la transición del sistema al estado de alta afinidad por  $\text{K}^+$  (Mendoza *et al.*, 1994). Además de la regulación mediada por la calcineurina, la actividad de las quinasas Hal4p y Hal5p parece contribuir también a esta respuesta frente a estrés salino (Mulet *et al.*, 1999). La activación del sistema de transporte TRK por acción de estas quinasas supone el incremento del flujo neto de entrada de iones  $\text{K}^+$  al citosol, la consecuente disminución del potencial de membrana generado por acción de Pma1p y, por tanto, la reducción significativa del nivel de entrada de iones  $\text{Na}^+$ , que se traduce a su vez en un aumento de la tolerancia celular al crecimiento en ambientes salinos (Mulet *et al.*, 1999).

La exposición de la levadura sensible a PMKT indujo una sobreexpresión de *TRK2* de aproximadamente 25 veces su nivel basal (Tabla 8). De forma complementaria a la actividad llevada a cabo por los sistemas detoxificadores de  $\text{Na}^+$  comentados anteriormente, sobre todo *ENA1/PMR2*, esta inducción de *TRK2* mediaría parte de la respuesta a la acción de la toxina *killer* análogamente a como interviene en los procesos de intoxicación provocados por la presencia de altas concentraciones de  $\text{NaCl}$  o  $\text{LiCl}$  en el medio extracelular (Garcíadeblas *et al.*, 1993; Mendoza *et al.*, 1994). La desestabilización del potencial de membrana por acción de PMKT implicaría una situación de estrés celular donde los transportes acoplados de iones y nutrientes de bajo peso molecular quedarían alterados y en la que la inducción de todos los sistemas de transporte mencionados contribuiría a paliar los efectos negativos, al menos, durante un corto periodo de tiempo (Santos & Marquina, 2004a). De forma concordante con esta afirmación, otros genes implicados en la respuesta a estrés iónico y en la detoxificación de sodio se vieron regulados positivamente en presencia de la toxina PMKT, entre ellos: *PHO84*, que codifica para un transportador de alta afinidad de fosfato inorgánico ( $\text{Pi}$ ) (Bun-Ya *et al.*, 1991); *PHO86*, uno de los genes que interviene en el proceso de maduración de Pho84p facilitando su salida del retículo endoplasmático y su empaquetamiento en vesículas (Bun-Ya *et al.*, 1996); *PHO87*, que codifica para un transportador de fosfato inorgánico de baja afinidad (Bun-Ya *et al.*, 1996; Auesukaree *et al.*, 2003); *PHO89*, que con un nivel de inducción de aproximadamente 20 veces su nivel inicial (Tabla 8) codifica para un transportador de alta afinidad de fosfato



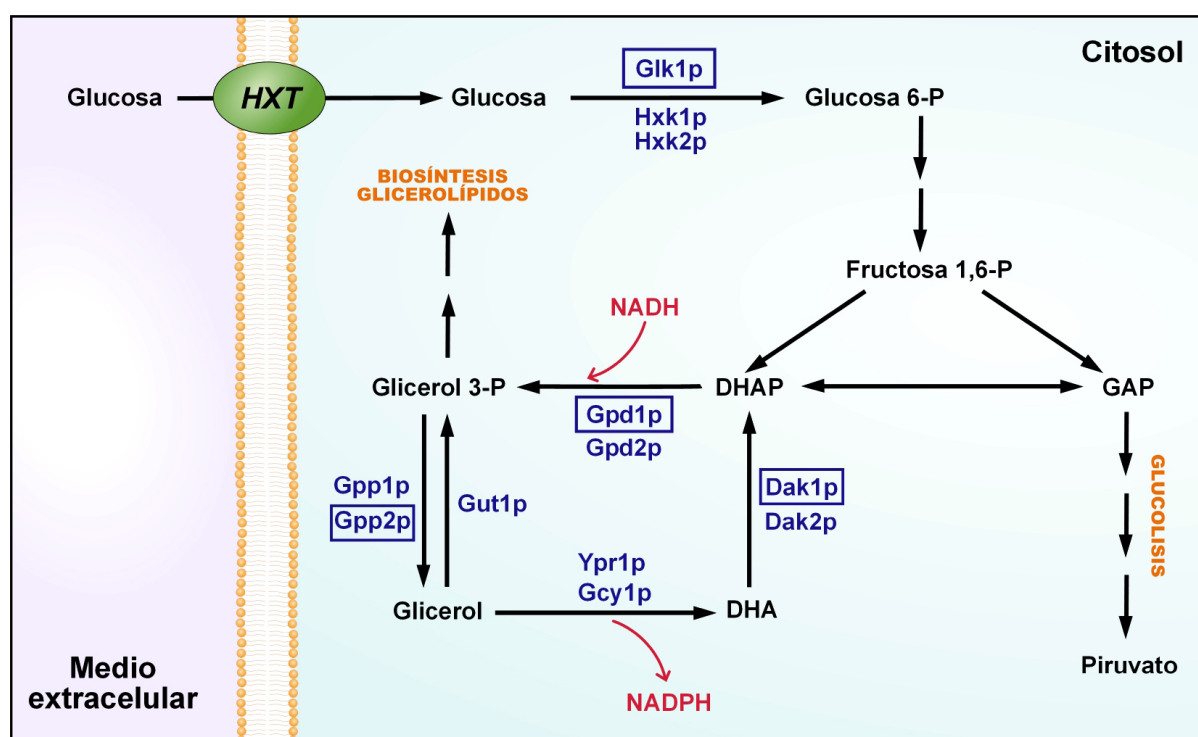
inorgánico acoplado a  $\text{Na}^+$  (Martínez & Persson, 1998; Pattison-Granberg & Persson, 2000); *ZRT1*, que codifica para un transportador de zinc localizado en la membrana plasmática que es el principal responsable del mantenimiento de la homeostasis de este catión en *S. cerevisiae* (Zhao & Eide, 1996; Gitan *et al.*, 1998); *CTR3*, que codifica para un transportador de alta afinidad de cobre (Pena *et al.*, 2000); *PDR12*, fuertemente inducido (Tabla 8) y que codifica para un transportador de tipo ABC localizado en la membrana plasmática que está implicado en la resistencia a estrés por la exposición a ácidos orgánicos débiles mediante la expulsión (ATP-dependiente) de aniones carboxilato solubles en agua (Piper *et al.*, 1998); *IST1*, implicado en la tolerancia a altas concentraciones de sodio (Entian *et al.*, 1999); y *PTK2*, una quinasa implicada en la regulación del transporte de iones a través de la membrana plasmática (Nozaki *et al.*, 1996; Erez & Kahana, 2002).

La regulación positiva de todos estos sistemas de transporte iónico por acción de PMKT, junto con los mencionados anteriormente en este apartado (detoxificación de  $\text{Na}^+$  y homeostasis de  $\text{K}^+$ ), así como el incremento significativo del nivel de sensibilidad mostrado por los mutantes de delección para cada uno de esos genes (Tabla 8), reiteraría una vez más que la alteración de la permeabilidad de la membrana plasmática en las células sensibles responde al mecanismo de acción primario de la toxina *killer* (Santos & Marquina, 2004a).

### 5.1.2 Síntesis y acumulación de osmolitos compatibles

Como ya se ha mencionado en el apartado 1.6.1, la activación de la ruta HOG en levaduras origina, entre otros posibles efectos, un aumento transitorio de la concentración de glicerol intracelular para compensar los niveles de osmolaridad externos y evitar las pérdidas de agua (Reed *et al.*, 1987; Davis, 1993; Gustin *et al.*, 1998). En *S. cerevisiae* la síntesis de glicerol se realiza a partir del intermediario glicolítico dihidroxiacetona fosfato, siendo reducido primeramente a glicerol 3-fosfato y posteriormente defosforilado para dar glicerol (Figura 20). Este primer paso del proceso es una reducción catalizada por la enzima glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (Gpd), que depende de NAD y que está codificada por dos isogenes denominados *GPD1* y *GPD2*. Mientras que *GPD2* parece inducirse sólo en condiciones de anaerobiosis (Ansell *et al.*, 1997; Costenoble *et al.*, 2000) o cuando se inhibe la actividad respiratoria de la célula de forma directa o indirecta (Ansell *et al.*, 1997; Ansell & Adler, 1999; Epstein *et al.*, 2001), Gpd1p parece ser la isoforma principalmente responsable de la reducción en situaciones de estrés hiperosmótico (ruta HOG) (Albertyn *et al.*, 1994; Pahlman *et al.*, 2001). Estudios con mutantes han demostrado que la delección de *GPD1* implica la aparición de un fenotipo osmosensible que es más severo en el caso del doble mutante *gpd1Δ/gpd2Δ* (Eriksson *et al.*, 2000), reduciéndose proporcionalmente el nivel

intracelular de glicerol y detectándose una gran acumulación de NADH (Ansell *et al.*, 1997). La segunda etapa en la producción de glicerol (defosforilación) implica la actividad de la enzima glicerol-3-fosfatasa (Gpp), también codificada por dos isogenes (*GPP1* y *GPP2*) (Norbeck *et al.*, 1996; Phalman *et al.*, 2001). A diferencia de los genes *GPD*, tanto *GPP1* como *GPP2* se inducen en respuesta a estrés hiperosmótico bajo el control, al menos parcial, de la ruta HOG (Norbeck *et al.*, 1996). Se ha comprobado que el doble mutante *gpp1Δ/gpp2Δ* manifiesta un fenotipo hipersensible cuando es expuesto a condiciones de alta osmolaridad, mientras que los mutantes de delección *GPP1* o *GPP2* por separado no se ven afectados por el cambio. Este hecho indica que ambas enzimas pueden actuar de forma indiferente en el proceso de producción de glicerol (defosforilación) cuando se expresan en nivel suficiente durante estrés osmótico (Pahlman *et al.*, 2001).



**Figura 20. Representación esquemática de las etapas principales del metabolismo intracelular del glicerol en *S. cerevisiae*.** El proceso muestra interconexiones con otras rutas metabólicas como la glucólisis o la biosíntesis de glicerolípido. En negro se muestran los intermediarios de la reacción global y en azul las proteínas que catalizan las reacciones de síntesis o degradación de dichos intermediarios. Las proteínas codificadas por genes cuyo nivel de expresión se vio regulado positivamente en presencia de la toxina PMKT (*GLK1*, aprox. 6; *GPD1*, aprox. 40; *GPP2*, aprox. 37; y *DAK1*, aprox. 8) aparecen destacadas con un rectángulo azul. Algunos miembros de la familia de genes *HXT* también fueron sobreexpresados en respuesta al tratamiento con la toxina (*HXT1*, aprox. 4; *HXT5*, aprox. 10; *HXT11*, aprox. 7; y *HXT14*, aprox. 6). La conversión de NADH a NADPH, con gasto asociado de una molécula de ATP, aparece representada en rojo. GAP, gliceraldehído fosfato; DHA, dihidroxiacetona; DHAP, dihidroxiacetona fosfato.

Nuestros resultados mostraron que algunas de las enzimas implicadas en la síntesis de glicerol se sobreexpresaron significativamente tras la exposición a PMKT (Tabla 8), pudiéndose relacionar este hecho con el incremento transitorio del nivel de glicerol intracelular detectado en la levadura sensible durante los 30 primeros minutos de

tratamiento con la toxina (Figura 12, A). De todos los genes inducidos, cabe destacar los niveles de expresión de: algunos miembros de la familia *HXT*, como *HXT1*, *HXT5*, *HXT11* y *HXT14*, que en *S. cerevisiae* codifican para distintos transportadores que son responsables de la entrada de glucosa en la célula (Kruckeberg, 1996; Kruckeberg *et al.*, 1998); *GLK1*, que codifica para una de las tres enzimas (glucoquinasa) responsables de catalizar la fosforilación de la glucosa en posición 6C durante la primera etapa (irreversible) del metabolismo intracelular de este azúcar (Gancedo *et al.*, 1977; Herrero *et al.*, 1995); *STL1*, que codifica para un transportador de glicerol acoplado a H<sup>+</sup> (simporte) que se induce durante estrés osmótico cuando las células se encuentran en medios ricos en glucosa creciendo de forma exponencial (Posas *et al.*, 2000; Rep *et al.*, 2000; Yale & Bohnert, 2001; Ferreira *et al.*, 2005); y, sobre todo, *PBS2*, *GPD1* y *GPP2*, que resultaron ser tres de los transcritos con los niveles de inducción más elevados durante el proceso de intoxicación con PMKT (Tabla 8) y cuya participación en la síntesis de glicerol ha sido comentada anteriormente (Figura 20).

En relación a los miembros de *HXT*, conviene tener en cuenta además la participación del factor de transcripción Rgt1 como elemento regulador de la expresión en respuesta a los niveles extracelulares de glucosa. En células que crecen activamente en presencia de mucha glucosa, Rgt1 se encuentra fosforilado y es incapaz de unirse a una secuencia consenso presente en los promotores de la mayoría de los genes de la familia *HXT*. De esta forma, la síntesis de los transportadores no se reprime y se permite un transporte de glucosa eficaz al interior (Kim *et al.*, 2003). En presencia de la toxina PMKT las células presentaron un nivel de represión del gen *RGT1* de aproximadamente 20 veces (Tabla 9). Este hecho podría estar indicando que al disminuir la síntesis del represor (Rgt1p) la síntesis de transportadores *HXT* se vería favorecida, de acuerdo con los resultados comentados anteriormente. Todas estas observaciones indicarían que el mecanismo de respuesta de la célula sensible a la acción de PMKT podría estar relacionado con, o desencadenar, la síntesis de glicerol. Puesto que se ha descrito que la toxina produce alteraciones en la membrana plasmática que afectan a su permeabilidad (Santos & Marquina, 2004a), los iones y metabolitos de bajo peso molecular acumulados en contra de gradiente en la célula sensible tenderían al equilibrio. De este modo, la inducción de la síntesis de glicerol podría ir encaminada a contrarrestar a corto plazo los efectos de PMKT (Figura 12). La producción de glicerol se pudo detectar a partir de los 30 primeros minutos de tratamiento con la toxina, alcanzando un valor máximo intracelular tras una hora. Este valor fue mucho menor en la cepa mutante carente del gen *HOG1* (*hog1Δ*). Dicha diferencia en los niveles de glicerol intracelular detectados (Figura 12, A) podría justificar la implicación de la ruta HOG en la regulación del metabolismo de glicerol como parte del proceso de

respuesta a la toxina. Tras una hora en contacto con PMKT la concentración celular de glicerol disminuyó paulatinamente (Figura 12, A) como consecuencia de su salida al medio (Figura 12, B).

Se ha comprobado que la activación de la ruta HOG inducida por estrés osmótico puede ponerse de manifiesto por la fosforilación de la proteína Hog1p (Rep *et al.*, 1999; de Nadal *et al.*, 2002; Westfall & Thorner, 2006; Choi *et al.*, 2008). De este modo, se determinaron los niveles intracelulares de la proteína Hog1p fosforilada en la cepa sensible *S. cerevisiae* BY4743 tras la exposición a PMKT mediante *Western Blot*. Se observó la rápida fosforilación de Hog1p a partir de los primeros 10 minutos de tratamiento con la toxina y el mantenimiento de la señal hasta el final del experimento (Figura 13), indicando la activación permanente de la ruta HOG. Este hecho, la presencia de una señal de fosforilación permanente, podría atribuirse a la pérdida continua de glicerol detectada en las células sensibles (Figura 12, B) como consecuencia del mecanismo de acción desarrollado por la toxina; y podría confirmarse gracias a las observaciones previas realizadas por otros grupos de investigación, que comprobaron que ciertas cepas mutantes de *S. cerevisiae* que son incapaces de producir o retener glicerol muestran un alto grado de fosforilación de Hog1p de forma constante a lo largo del tiempo (Siderius *et al.*, 2000). Se ha sugerido que una vez alcanzada una presión de turgor intracelular adecuada, determinada en parte por el nivel de glicerol, se produce la desactivación de la ruta de señalización HOG (Reiser *et al.*, 2003). Dicha regulación debida al turgor celular no se originaría en las células tratadas con PMKT, puesto que el glicerol se pierde de forma continua. La sobreexpresión del gen *PBS2* en respuesta a la toxina (20 veces aprox.; Tabla 8), que codifica para la MAPKK de la ruta HOG, podría estar ratificando, a nivel transcripcional, la activación postraducciona observada mediante la determinación del grado de fosforilación de Hog1p.

Estos resultados pondrían de manifiesto una compleja interdependencia del mecanismo de acción de PMKT y la ruta de señalización HOG (Figura 22). Además, las conclusiones obtenidas del análisis basado en *Northern Blotting* para una selección de genes cuya expresión depende de Hog1p (Figura 11), donde se pudo observar una inducción permanente de la síntesis de ARNm, corroborarían la hipótesis de que la toxina genera un estímulo continuo en la célula sensible en el que iones y ciertos metabolitos intracelulares de bajo peso molecular como el glicerol (Figura 12) atravesarían la membrana plasmática de forma no regulada afectando a la homeostasis celular. Finalmente, esta ruptura progresiva del equilibrio homeostático a través de la membrana plasmática implicaría a un incremento de la tasa de mortalidad de las células intoxicadas, de acuerdo con los resultados previos obtenidos por Santos & Marquina (2004a).

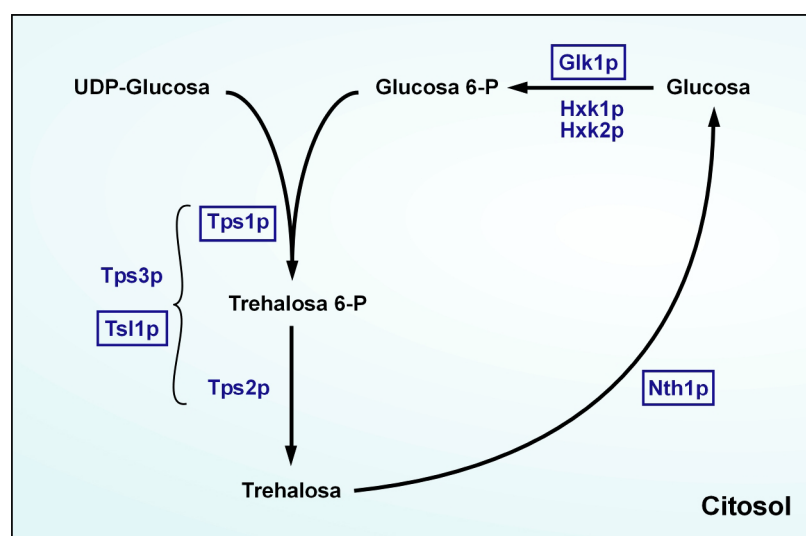
Después del incremento inicial (30 minutos), el contenido intracelular de glicerol disminuyó progresivamente durante el tratamiento con PMKT hasta alcanzar valores ligeramente inferiores a los basales detectados a tiempo cero (Figura 12, A). Este hecho estaría de acuerdo con las observaciones previas realizadas por los autores Santos & Marquina (2004a), que pusieron de manifiesto la capacidad de la toxina para incrementar la permeabilidad de la membrana plasmática de las células sensibles durante el proceso de intoxicación (Santos & Marquina, 2004a). Cuando por diferentes mecanismos una célula pierde la capacidad de mantener el estado polarizado de su membrana plasmática, cualquier ion o metabolito acumulado en el citosol en contra de gradiente de concentración tenderá al equilibrio, estableciéndose un flujo de salida al exterior (ej:  $K^+$ , ATP, glicerol). Estos procesos podrían justificar además la acidificación del pH intracelular observada simultáneamente al incremento del nivel extracelular de glicerol 30 minutos después de la adición de la toxina (Figura 12, B) y estaría de acuerdo con el hecho de que el tratamiento con PMKT provoca la pérdida de ciertos iones como por ejemplo el  $K^+$  (Figura 22) (Santos & Marquina, 2004a). La capacidad directa de la toxina para generar poros (canales no selectivos) en la membrana plasmática a través de los cuales el glicerol pudiese ser liberado al exterior, al menos durante los primeros momentos de la acción citotóxica de PMKT, se descartó de acuerdo con las observaciones previas realizadas por los autores Santos & Marquina (2004a). Estos estudios basados en *Patch Clamp* sugerían que la actividad de la toxina era, durante la fase temprana de su interacción con la célula sensible, responsable de la formación de canales iónicos no regulados por los que el glicerol no escaparía (Figura 22).

Por otro lado, el glicerol puede proporcionar otros mecanismos de protección celular. El reciclaje del glicerol hasta dihidroxiacetona fosfato, junto a la actividad desarrollada por las enzimas Gpd y Gpp, completa un ciclo (actividad global transhidrogenasa) que es capaz de convertir NADH en NADPH con el gasto asociado de una molécula de ATP (Figura 20) (Norbeck & Blomberg, 1997; Godon *et al.*, 1998). El NADPH es un donador de electrones que interviene en varios sistemas de defensa frente a estrés oxidativo (Santoro & Thiele, 1997). Su obtención a partir del glicerol se consigue en dos etapas consecutivas, una reducción llevada a cabo por una enzima glicerol deshidrogenasa (dependiente de NADPH) que convierte el glicerol en dihidroxiacetona y una fosforilación por parte de una quinasa que transforma finalmente la dihidroxiacetona en dihidroxiacetona fosfato (Costenoble *et al.*, 2000). Esta última enzima (dihidroxiacetona quinasa) esta codificada por dos isogenes, *DAK1* y *DAK2* (Norbeck & Blomberg, 1997). La expresión de *DAK1* en *S. cerevisiae* se ve incrementada en respuesta a distintos tipos de estrés, entre otros: estrés iónico (Norbeck & Blomberg, 1997), estrés por choque térmico (Boy-Marcotte *et al.*, 1999), estrés osmótico

(Gash *et al.*, 2000; Rep *et al.*, 2000) y estrés oxidativo (Godon *et al.*, 1998). Cuando *S. cerevisiae* se somete a condiciones de estrés osmótico por la presencia de NaCl en el medio, se produce la inducción simultánea de los genes *GPD1*, *GPP2* y *DAK1* (Norberck & Blomberg, 2000). Aunque su papel no está del todo claro, además de su función como sistema multienzimático con actividad transhidrogenasa para la obtención de NADPH, comentado anteriormente (Norbeck & Blomberg, 1997; Godon *et al.*, 1998), es probable que este grupo de genes funcione también como complemento del sistema Fps1p en la regulación parcial de las reservas intracelulares de glicerol (Norbeck & Blomberg, 1997), como sistema detoxificador de dihidroxiacetona (Molin *et al.*, 2003) o como componente de un ciclo fútil de ATP activado en situaciones de estrés para corregir las posibles alteraciones de los niveles de ATP intracelular (Blomberg, 2000). El tratamiento de la célula sensible con la toxina PMKT provocó, además del aumento de los niveles de transcripción de *GPD1* y *GPP2* descrito anteriormente, la inducción de la expresión de *DAK1* (Tabla 8). De este modo, es posible que el ciclo de reciclaje de glicerol hasta dihidroxiacetona fosfato forme parte del mecanismo global de respuesta a la toxina. Y aunque esta contribución en la respuesta no puede ser determinada de forma rigurosa (formación de NADPH frente a estrés oxidativo, regulación de los niveles de glicerol intracelular, detoxificación de dihidroxiacetona, etc.), al menos la regulación positiva de este grupo de genes reitera la correlación entre las respuestas bioquímicas conocidas a estrés hiperosmótico y la respuesta al tratamiento con la toxina PMKT. Conviene destacar que, comparando los niveles de expresión de sendos genes (*GPD1* -aprox. 40-, *GPP2* -aprox. 37- y *DAK1* -aprox. 8-; Tabla 8), es muy probable que la contribución de este mecanismo de detoxificación en la respuesta global al proceso de intoxicación sea cuantitativamente menor que aquella generada por la síntesis de glicerol *per se*. Esta diferencia también quedaría patente al compararse los porcentajes de hipersensibilidad mostrados por cada uno de los mutantes de delección para esos genes (Tabla 8).

La trehalosa es un disacárido no reductor formado por dos moléculas de glucosa unidas por enlaces  $\alpha$  que desempeña importantes funciones fisiológicas en levaduras y otros organismos (Elbein, 1974; Thevelein, 1984; Francois & Parrou, 2001). Se trata de un metabolito cuyo nivel intracelular en *S. cerevisiae* está determinado por la regulación enzimática de su ciclo de síntesis y degradación (Figura 21). Su síntesis está catalizada por un complejo enzimático, trehalosa sintasa (TPS), que está codificado por cuatro genes diferentes: *TPS1*, que codifica para la trehalosa-6-fosfato sintasa que cataliza la conversión de una molécula de UDP-glucosa y otra de glucosa-6-fosfato en una molécula de trehalosa-6-fosfato; *TPS2* (trehalosa-6-fosfato fosfatasa), que es responsable de la síntesis de trehalosa a partir de la trehalosa-6-fosfato obtenida en la etapa anterior; y *TPS3* y *TSL1*, que

codifican para dos subunidades reguladoras del complejo TPS (Francois & Parrou, 2001). Todos estos genes constituyentes del complejo TPS se inducen en respuesta a distintos tipos de estrés, incluyendo estrés osmótico (Winderickx *et al.*, 1996). En este proceso de síntesis habría que tener también en cuenta la participación de otras enzimas capaces de aportar algunos de los intermediarios necesarios en la reacción (Figura 21). Entre estas enzimas, cabe destacar la actividad de: las hexoquinas Hxk1p y Hxk2p (codificadas por los genes *HXK1* y *HXK2*, respectivamente) y la glucoquinasa Glk1p (*GLK1*), inducidas diferencialmente en respuesta a distintos factores ambientales (Gancedo *et al.*, 1977; Lobo & Maitra, 1977; Fernández *et al.*, 1986; Herrero *et al.*, 1995; Rodríguez *et al.*, 2001) y que catalizan la producción (irreversible) de glucosa-6-fosfato a partir de glucosa; la UDP-glucosa pirofosforilasa (gen *UGP1*), que cataliza la formación (reversible) de UDP-glucosa a partir de glucosa-1-fosfato y UTP (Daran *et al.*, 1995, 1997; Nishizawa *et al.*, 2001); y la fosfoglucomutasa (gen *PGM2*), que de forma reversible cataliza la conversión de la glucosa-1-fosfato procedente del metabolismo de la galactosa o la hidrólisis del glucógeno en glucosa-6-fosfato (Toi & Douglas, 1964; Kukuruzinska *et al.*, 1987; Oh & Hopper, 1990).



**Figura 21. Representación esquemática del ciclo de síntesis y degradación intracelular de trehalosa.** Algunas de las etapas que constituyen este ciclo (*glucosa* → *glucosa 6-P*) se comparten con el proceso de glucólisis. En negro se muestran los intermediarios de la reacción global y en azul las proteínas que catalizan las reacciones de síntesis o degradación de dichos intermediarios. Las proteínas codificadas por genes cuyo nivel de expresión se vio regulado positivamente en presencia de la toxina PMKT (*GLK1*, aprox. 6; *TPS1*, aprox. 11; *TSL1*, aprox. 4; y *NTH1*, aprox. 3) aparecen destacadas con un rectángulo azul.

El proceso de hidrólisis de la trehalosa está regulado por dos sistemas enzimáticos diferentes, una trehalasa neutra codificada por *NTH1* o *NTH2* (Kopp *et al.*, 1993; Nawaka *et al.*, 1995) y una trehalasa ácida codificada por el gen *ATH1* (Destruelle *et al.*, 1995). De ellas, Nth1p parece ser la única enzima capaz de catalizar la movilización intracelular de trehalosa a nivel del citosol cuando las células se encuentran en fase de crecimiento

exponencial en un medio con glucosa (Figura 21) (Nawaka & Holzer, 1998; Nawaka *et al.*, 1995; Parrou *et al.*, 1999; Jules *et al.*, 2008). El nivel intracelular de trehalosa que resulta de este ciclo de síntesis y degradación es el que determina su función fisiológica. En *S. cerevisiae* se ha comprobado, por un lado, su capacidad para servir como carbohidrato de reserva (Lillie & Pringle, 1980), acumulándose en el interior de la célula durante la fase estacionaria y siendo rápidamente movilizada al reanudarse los procesos de crecimiento (Munch *et al.*, 1992; Jules *et al.*, 2005); y por otro, su capacidad para funcionar como agente protector de estructuras celulares específicas (proteínas y membranas biológicas) frente a ciertos tipos de estrés ambiental (Van Laere, 1989; Wiemken, 1990; Singer & Lindquist, 1998a, 1998b), entre los que se incluyen: choque térmico (De Virgilio *et al.*, 1994, Lewis *et al.*, 1995), estrés por congelación (Lewis *et al.*, 1995), deshidratación y desecación (Gadd *et al.*, 1987; Hottiger *et al.*, 1987; D'Amore *et al.*, 1991), y la exposición a sustancias químicas tóxicas (Attfeld, 1987). Su función como agente osmoprotector fue comprobada por Mackenzie *et al.* (1988) y Hounsa *et al.* (1998), relacionándose directamente el nivel intracelular de trehalosa con la supervivencia de la levadura cuando esta es expuesta a condiciones de estrés osmótico severo. De forma contraria, se ha descrito que la trehalosa no se acumula en concentraciones significativas en los casos de estrés mediados por la presencia de sal en el medio (Zähringer *et al.*, 1997; Nwaka & Holzer, 1998). Teniendo en cuenta las enzimas que intervienen en el proceso de síntesis e hidrólisis, la presencia de altas concentraciones intracelulares de Glk1p y Nth1p (Figura 21) podría explicar el hecho de que la trehalosa no se acumule como osmoprotector en condiciones de estrés salino. Esta síntesis y degradación de trehalosa, junto con la producción de glicerol, juega un papel clave en la protección frente a altas concentraciones de sal. Esta afirmación, también basada en cambios de expresión génica, ha sido propuesta previamente (Nwaka & Holzer, 1998) y confirmaría nuevamente el hecho de que PMKT genera una respuesta HOG muy similar a aquellas obtenidas frente estrés hiperosmótico.

Al igual que en el caso del glicerol, genes implicados la movilización de trehalosa como *TPS1*, *TSL1* y *NTH1* fueron inducidos en respuesta a la acción de la toxina PMKT (Tabla 8). Teniendo en cuenta los valores de inducción obtenidos para cada uno de esos genes (11, 4 y 3, respectivamente), podría asumirse que, en presencia de la toxina, el metabolismo relacionado con la trehalosa está dirigido hacia la síntesis de la misma (Figura 21), pudiendo complementar la acción del glicerol en su protección frente al estrés producido. Sin embargo, puesto que los mutantes de delección carentes de cada uno de esos genes (*TPS1*, *TSL1* y *NTH1*) presentaron una sensibilidad a la toxina muy parecida a la cepa sensible tipo, es posible que este nivel de acumulación de trehalosa no sea suficiente y contribuya escasamente a contrarrestar los efectos citotóxicos generados por PMKT.



## 5.2. Mecanismos generales de respuesta a estrés

En *S. cerevisiae* se ha comprobado que aproximadamente el 66% de todo el genoma conocido está implicado en la respuesta adaptativa transitoria a varios tipos de estrés diferentes (calor, ácido, álcali, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NaCl, sorbitol y crecimiento diaúxico) (Causton *et al.*, 2001). Asimismo, se ha demostrado que más de un 10% de los genes que son inducidos o reprimidos en estas condiciones se comportan como un grupo con identidad propia que aparece de forma común en cada uno de los tipos de estrés ensayados, definiéndose por tanto como genes específicos de respuesta a estrés ambiental. Cuando una célula es sometida a una situación de estrés, la respuesta que se genera suele incluir dos componentes fundamentales: por un lado, elementos implicados en la protección específica contra esa forma de estrés; y por otro, elementos encargados de proteger a la célula frente a daños más generales, que se producen de forma común por tipos de estrés muy diferentes. Este mecanismo general de respuesta implica principalmente cambios en el programa transcripcional que culminan con la síntesis de proteínas cuyas funciones ejercen una protección frente a los efectos negativos provocados por el estrés, habiéndose descrito que la exposición a un tipo de estrés concreto incrementa fuertemente su capacidad de resistencia a otro diferente (Causton *et al.*, 2001). De todas estas proteínas, el grupo de las HSPs (*Heat Shock Proteins*) o proteínas de choque térmico, muy conservado en eucariotas y procariotas (Ellis & van der Vies, 1991; Gething & Sambrook, 1992), juega un papel clave en el establecimiento de un correcto sistema de protección (Lindquist & Craig, 1988). En condiciones normales, las HSPs se expresan de forma constitutiva funcionando, bien como chaperonas moleculares que favorecen el plegamiento correcto de ciertas proteínas, o bien como elementos reguladores de algunos procesos metabólicos básicos para el crecimiento y la supervivencia celular (termotolerancia, glucólisis y poliubiquitinación) (Parsell & Lindquist, 1994). En un principio su inducción quedó demostrada por el tratamiento con altas temperaturas (choque térmico), comprobándose posteriormente la implicación de otros muchos tipos de estrés ambiental diferentes (Lindquist & Craig, 1988; Watson, 1990; Nover, 1991; Yamamoto *et al.*, 2007).

En *S. cerevisiae*, los genes *heat shock* están regulados principalmente gracias a la actividad de un factor de transcripción denominado *Heat Shock Factor* (HSF) que está codificado por el gen *HSF1* (Wiederrecht *et al.*, 1988). Ciertas regiones hidrofóbicas de Hsf1p median la formación del un homotrímero que es capaz de interaccionar con secuencias específicas del ADN (múltiples repeticiones invertidas de la secuencia nGAAn) conocidas como elementos de respuesta al choque térmico o HSE (*Heat Shock Element*) (Bienz M & Pelham HRB, 1987; Pirkkala *et al.*, 2001). En la mayoría de los organismos

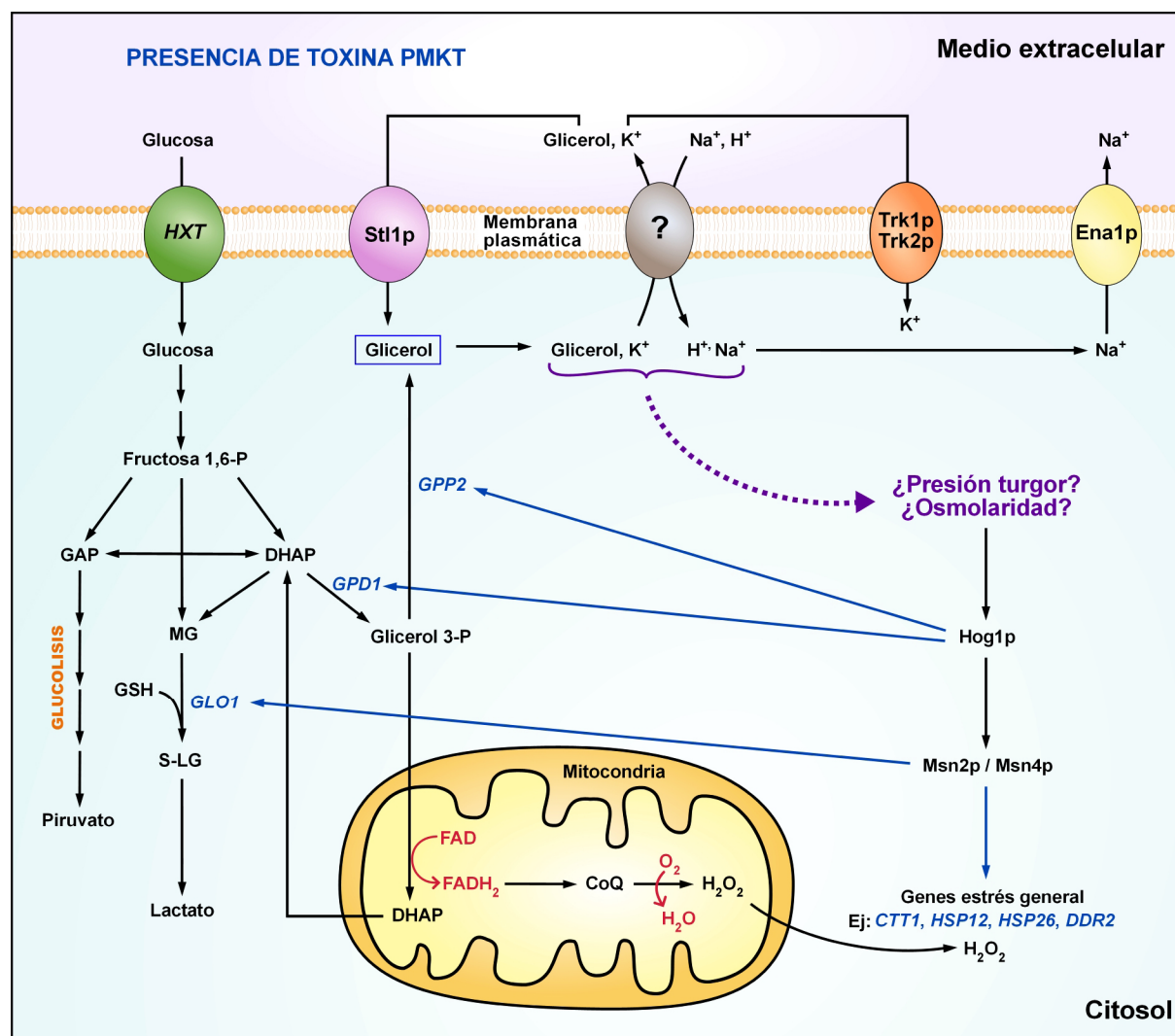
eucariotas, la trimerización y unión al ADN se produce tras una activación por calor (Sorger *et al.*, 1987). Sin embargo, en *S. cerevisiae* el HSF se encuentra unido al HSE de forma constitutiva, quedando expuestos sus dominios activadores de la transcripción sólo tras la inducción por calor (Jakobsen & Pelham, 1988; Gross *et al.*, 1990). La transcripción de los genes regulados por HSF, con secuencias HSEs incluidas en sus promotores, codifican para diversos tipos de HSPs, chaperonas, enzimas metabólicas y proteínas de la pared celular (Trott & Morano, 2003; Hahn *et al.*, 2004; Yamamoto *et al.*, 2005). Aunque la actividad transcripcional del factor está estrechamente relacionada, en un extenso rango de temperaturas, con el nivel de fosforilación del mismo (diferencias entre el estado basal y el inducido) (Sorger, 1990, 1991), aún se desconoce el mecanismo exacto por el cual la fosforilación podría activar a HSF. Otro factor de transcripción que juega un papel importante en la regulación de la expresión de los genes *heat shock* y de otros genes implicados en la respuesta general a estrés es Msn2p/4p (Ferguson *et al.*, 2005), habiéndose comprobado su activación en situaciones de estrés osmótico, estrés oxidativo, disponibilidad limitada de glucosa, pH extracelular bajo, exposición a ácido sórbico y tratamiento con etanol (Martínez-Pastor *et al.*, 1996; Schmitt & McEntee, 1996; Gasch, *et al.*, 2000; Causton, *et al.*, 2001). En este caso, la activación del factor implica su unión a elementos específicos denominados STREs (*Stress Response Elements*), con secuencia consenso 5'-CCCCT-3', localizados en los promotores de muchos genes de respuesta a estrés, como por ejemplo *HSP42*, *DDR2* y *CTT1* (Marchler *et al.*, 1993; Kobayashi & McEntee, 1993). Algunos de esos genes, como *HSP12* y *HSP30* (Varela *et al.*, 1995; Haitani *et al.*, 2006), contienen incluso ambas secuencias HSEs y STREs en sus promotores.

El porcentaje de genes relacionados con la respuesta general a estrés que se reguló positivamente tras la exposición de la levadura sensible a PMKT fue del 17%. De todos esos genes, aquellos implicados en la síntesis de HSPs (*HSP12*, *HSP104*, *HSP82*, *HSP26*, *DDR2*, *SSA2*, *SSB2* y *SSA1*) tuvieron una representación del 50%, adquiriendo además niveles de expresión altamente significativos en respuesta a la toxina *killer* (Tabla 8) (Figura 22). La proteína Hsp12p mostró una tasa de inducción de aproximadamente 57 veces su nivel basal, la más alta registrada. Se trata de una proteína de bajo peso molecular (12 kDa) localizada en la membrana plasmática que interviene en la protección frente a la pérdida de agua intracelular (Praekelt & Meacock, 1990; Garay-Arroyo *et al.*, 2000; Sales *et al.*, 2000). Su expresión se ve incrementada en respuesta a varios tipos de estrés diferentes, incluyendo la exposición a etanol, procesos oxidativos y baja disponibilidad de glucosa (Praekelt & Meacock, 1990; Jamieson *et al.*, 1994; Piper *et al.*, 1994; Varela *et al.*, 1995). Esta sobreexpresión de *HSP12* también ha sido comprobada en el caso de estrés hiperosmótico, quedando patente la implicación de la ruta HOG al detectarse la

translocación al núcleo de algunos de los factores de transcripción regulados por la proteína Hog1p fosforilada (Martínez-Pastor *et al.*, 1996; Görner *et al.*, 1998; Rep *et al.*, 1999). Asimismo, otro gen inducido por choque hiperosmótico y regulado por HOG, *HSP26* (Varela *et al.*, 1992), que codifica para una chaperona citosólica de bajo peso molecular que suprime la formación de agregados de proteínas con plegamiento incorrecto (Bentley *et al.*, 1992), se sobreexpresó en respuesta a la toxina *killer*. Por otro lado, el tratamiento con PMKT indujo la transcripción otras HSPs reguladas de forma independiente a la activación de la ruta HOG. Entre ellas: la Hsp104p, esencial para la termotolerancia inducida en levaduras (Sánchez *et al.*, 1992; Linnquist & Kim, 1996), que media la renaturalización (ATP-dependiente) de proteínas a partir de agregados insolubles una vez producido el daño celular (Parsell *et al.*, 1994; Schirmer *et al.*, 1996); la Hsp82p, que en *S. cerevisiae* constituye la isoforma inducible por estrés de la chaperona molecular Hsp90p de mamíferos (Borkovich *et al.*, 1989; Nathan *et al.*, 1997) y que interviene en la activación de ciertas quinasas y factores de transcripción implicados en diversos procesos de señalización celular (Picard, 2002; Burnie *et al.*, 2006); la proteína codificada por el gen *DDR2*, que se ve fuertemente inducida por choque térmico y por tratamientos que provocan alteraciones en el ADN (Kobayashi *et al.*, 1996), estando el primero de estos procesos regulados de forma independiente a la actividad del HSF (Kobayashi & McEntee, 1990); las chaperonas citoplasmáticas Ssa1p y Ssa2p, ambas pertenecientes a la familia de las HSP70 (Werner-Washburne, *et al.*, 1987), que se expresan de forma constitutiva en la célula y que regulan la síntesis, el transporte y la intervención de ciertas proteínas en el proceso de respuesta a estrés (Bush & Meyer, 1996; Kim *et al.*, 1998; Shulga *et al.*, 1999; Satyanarayana *et al.*, 2000; Cashikar *et al.*, 2005; Haslbeck *et al.*, 2005); y Ssb2p, también perteneciente al grupo de las HSP70 (Werner-Washburne, *et al.*, 1987), que es una chaperona localizada en el ribosoma de la célula que forma parte del complejo RAC (*Ribosome Associated Complex*) (Pfund *et al.*, 2001) y que contribuye al correcto plegamiento de las proteínas que se están sintetizando (Becker & Craig, 1994; Bukao & Horwich, 1998).

El análisis de los perfiles de expresión de las HSPs inducidas durante el experimento reveló ciertas semejanzas con el patrón de HSPs que se sobreexpresa de forma común durante la respuesta general a distintos tipos de estrés (Causton *et al.*, 2001) y con el que se sobreexpresa durante la respuesta específica al tratamiento por acetaldehído (Aranda *et al.*, 2002). De forma global, exceptuando el caso de Hsp12 y Hsp26 comentado anteriormente, se pudo comprobar que la mayoría de estas HSPs inducidas durante el tratamiento con PMKT no están implicadas en la regulación de la respuesta transcripcional a situaciones de estrés hiperosmótico. De hecho, este patrón de HSPs que interviene en la respuesta a la acción de la toxina resulta diferente a aquellos que se inducen en respuesta a estrés

osmótico determinados por otros investigadores (Yale & Bohnert, 2001), indicando que distintos grupos de HSPs podrían tener diferentes objetivos funcionales según respondiesen a estrés osmótico o a PMKT. La sensibilidad incrementada a la toxina de prácticamente todos los mutantes de genes HSPs confirmaría la gran implicación de estas proteínas en el mecanismo de respuesta a la acción citotóxica de la toxina, destacando sobre todo el papel de la Hsp12, la Hsp26 y la proteína DDR2 (Figura 22).



**Figura 22. Mecanismo de acción propuesto para PMKT y respuesta transcripcional en *S. cerevisiae*.** La toxina interacciona con la membrana plasmática, de forma directa o indirecta, a través de un mecanismo desconocido que conduce al desequilibrio de la homeostasis celular (?). Se ha comprobado que el tratamiento con PMKT induce el paso de iones fisiológicos ( $H^+$ ,  $K^+$  y  $Na^+$ ) y metabolitos de bajo peso molecular (ej: glicerol) a través de la membrana plasmática (Santos & Marquina, 2004a). Estas alteraciones son detectadas por la célula sensible de una forma aún no caracterizada (ej: cambios en la presión de turgor o alteraciones del nivel de osmolaridad intracelular) que provoca la activación de una respuesta transcripcional a través de la fosforilación de Hog1p. Genes como *ENA1* y *TRK2* se inducen para tratar de evitar los procesos de intoxicación metabólica provocados por la entrada de  $Na^+$  en la célula y para restablecer los niveles intracelulares de  $K^+$ . Genes implicados en la respuesta a estrés general (ej: *CTT1*, *HSP12*, *HSP26*, *DDR2*, etc.) y genes como *GPD1* y *GPP2*, implicados en la síntesis de glicerol, se sobreexpresan también para contrarrestar la acción citotóxica de la toxina. La pérdida de glicerol e iones fisiológicos de la levadura sensible conducen al proceso de muerte celular. En negro se representan los intermediarios de reacción y las proteínas más relevantes que intervienen en el proceso global. En azul se representan algunos de los genes sobreexpresados en respuesta a la toxina PMKT. La proteína Stt1p y algunos miembros de la familia HXT también se regularon positivamente tras el tratamiento con la toxina. GAP, gliceraldehído fosfato; DHAP, dihidroxiacetona fosfato; MG, metilglioxal; CoQ, coenzima Q; S-LG, S-D-lactoil-glutacion; GSH, glutation.

Además de las HSPs inducidas, nuestros resultados mostraron un incremento de la expresión de otras proteínas relacionadas con la respuesta a estrés tras la exposición a PMKT (Tabla 8), destacando sobre todo la inducción de Ctt1p (catalasa T citosólica) y Sch9p. La función fisiológica de la catalasa T aún se desconoce, pero se cree que podría jugar un papel importante, junto con la catalasa A (Cta1p), en la protección celular frente a los efectos perjudiciales producidos por especies reactivas de oxígeno (ROS) cuando el principal sistema de acción antioxidante GSH (tripéptido glutation) está inactivo (Grant *et al.*, 1998). La expresión del gen *CTT1* está regulada por múltiples tipos de estrés diferentes: estrés osmótico, estrés oxidativo, choque térmico, baja disponibilidad de glucosa, presencia de ácidos débiles o etanol, etc. (Marchler *et al.*, 1993). Al incrementarse la osmolaridad del medio extracelular, la sobreexpresión de *CTT1* ocurre rápidamente a través de la ruta HOG mediante la activación de los factores de transcripción Msn2p/4p (Belazzi *et al.*, 1991), resultando ser esta sobreexpresión muy importante para la asegurar viabilidad celular bajo condiciones de estrés osmótico severo (Schuller *et al.*, 1994). Durante este periodo de osmoadaptación, la quinasa Sch9p, a través de la activación de Sko1p y junto a Hog1p, interviene en la regulación de los niveles de expresión de *CTT1* y otros genes de respuesta a estrés actuando como activador transcripcional (Roosen *et al.*, 2005; Pascual-Ahuir & Proft, 2007). Se ha comprobado que la delección de los genes *CTT1* (Schuller *et al.*, 1994) y *SCH9* (Pascual-Ahuir & Proft, 2007) provoca un incremento en la sensibilidad a condiciones de estrés hiperosmótico. Un resultado similar pudo observarse tras el tratamiento de los mutantes *sch9Δ* y *ctt1Δ* con PMKT, indicando nuevamente en este caso la posible existencia de un mecanismo análogo de respuesta a la toxina *killer* y a los niveles elevados de osmolaridad en el medio extracelular (Figura 22).

PMKT indujo también la sobreexpresión del factor de transcripción *YAP1*, que interviene en la respuesta frente a estrés oxidativo (Kuge *et al.*, 1997; Toone & Jones, 1999; Temple *et al.*, 2005; Brombacher *et al.*, 2006) y que parece ser el factor responsable del rápido establecimiento de una respuesta transcripcional transitoria en estas condiciones (Lucau-Danila *et al.*, 2005). Yap1p se une, *in vivo*, a promotores de genes que no se regulan automáticamente de forma positiva, quedando esta acción condicionada por su localización celular (Kuge *et al.*, 1997; Gulshan *et al.*, 2005) y regulándose negativamente por el sistema de la tiorredoxina (*TRR1*, *TRX2*) (Izawa *et al.*, 1999; Carmel-Harel *et al.*, 2001) y por el de la calcineurina (Yokoyama *et al.*, 2006). El tratamiento con ciertos agentes antifúngicos (benomilo) también induce la sobreexpresión de *YAP1*, habiéndose comprobado que el patrón de genes regulados por este factor de transcripción en estas condiciones es diferente al que se observa tras la exposición a  $H_2O_2$  u otros agentes químicos que alteren el estado redox de la célula (estrés oxidativo) (Nguyen *et al.*, 2001; Lucau-Danila *et al.*, 2005). De

forma similar, el incremento del nivel de expresión de *YAP1* observado tras el tratamiento de la célula sensible con PMKT, cuya contribución substancial a nivel global se justificaría por la alta sensibilidad del mutante *Yap1Δ*, podría provocar la activación de un determinado grupo de genes de acuerdo con la naturaleza química específica de la toxina *killer*.

### 5.3. Determinación del receptor secundario de la toxina *killer* PMKT

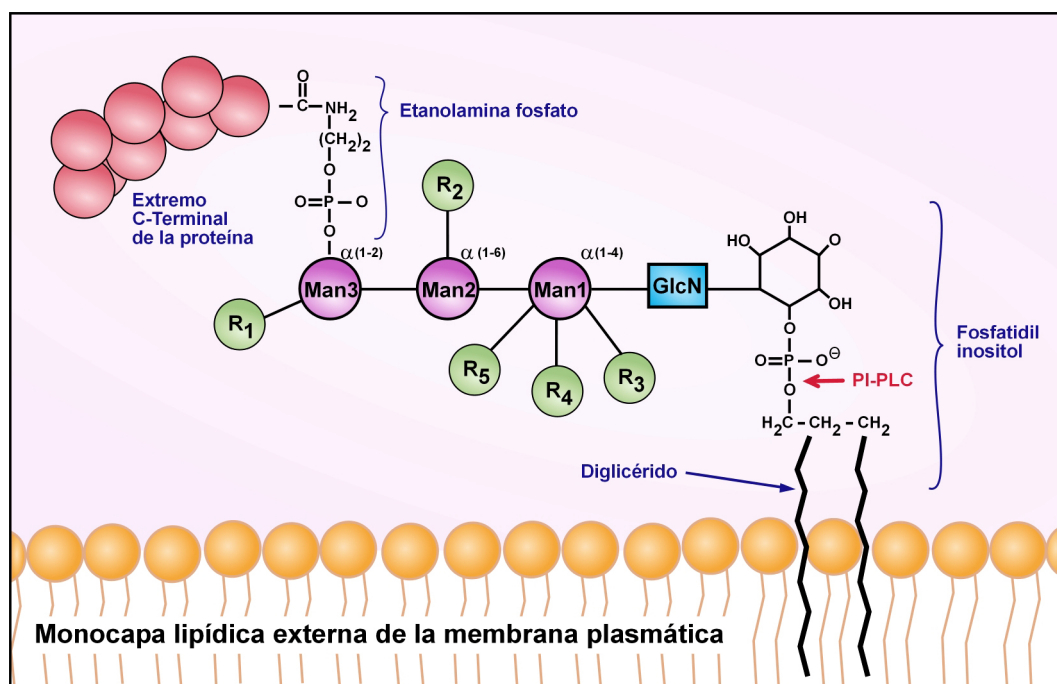
#### 5.3.1. Proteínas con anclaje tipo GPI como posibles receptores funcionales de la toxina PMKT

En *S. cerevisiae* se ha comprobado que al menos un 20% (1200 genes) del genoma conocido está directa o indirectamente relacionado con la pared celular (de Groot *et al.*, 2001), indicando que su arquitectura constituye una parte importante del metabolismo global de la levadura. A pesar de su aparente rigidez, la pared celular es una estructura dinámica, en continua remodelación, cuya regulación depende del perfecto equilibrio entre las rutas de síntesis y degradación de las macromoléculas que la integran y de la capacidad de secreción dirigida de enzimas activas y componentes específicos en las zonas donde son requeridos (Cid *et al.*, 1995). El resultado de estos procesos de síntesis y degradación supone la determinación de la composición específica de la pared, habiéndose comprobado su dependencia directa a los cambios del entorno, al estado fisiológico de la célula y al ciclo celular (Biely, 1978; Díaz *et al.*, 1992; Cid *et al.*, 1995).

En este contexto, con el objetivo principal de profundizar en el mecanismo de acción de PMKT y, específicamente, identificar aquellas proteínas de la periferia celular que pudiesen estar implicadas en la actividad *killer* de PMKT como receptores, se estudió la supervivencia a la toxina de una colección de mutantes de delección de genes no esenciales que codifican proteínas localizadas o relacionadas con la periferia celular (Tabla 10). Este estudio reveló que la sensibilidad a PMKT podía verse incrementada o disminuida en dichos mutantes (protoplastos y células completas), mostrándose así un fenotipo más sensible o resistente, respectivamente. En este caso, a diferencia de lo descrito en los estudios de la respuesta transcripcional a la toxina, donde el nivel de hipersensibilidad de los mutantes de delección de los genes sobreexpresados podía justificar en sentido amplio su grado de participación en la respuesta celular a la acción de la toxina, el aumento de la resistencia pudo relacionarse directamente con la pérdida de algún componente necesario para el correcto desarrollo de la actividad *killer*. En general, como resultado del experimento, pudo comprobarse que la delección individual de la mayoría de los genes estudiados, con un amplio rango de funciones diferentes, tenía poco o ningún efecto sobre la resistencia de las

células completas a PMKT (Tabla 10). Este hecho estaría indicando que solamente un grupo reducido de proteínas y estructuras específicas están directamente relacionadas con la actividad de la toxina a nivel de la periferia celular, como por ejemplo las codificadas por los genes *LAS21*, *DFG5*, *CWP1* y *CWP2*, entre otros.

Resultó de particular interés en la determinación del receptor de PMKT el análisis de la sensibilidad y la capacidad de unión a la toxina en los mutantes implicados en la síntesis e inserción de la fracción GPI (Tabla 11). El anclaje GPI (glucosil fosfatidil inositol) es un complejo de glucofosfolípidos que se añade a nivel postraduccional en el extremo C-terminal de ciertas proteínas durante su procesamiento a lo largo de las rutas secretoras de las células, después de que hayan sido translocadas al interior del retículo endoplasmático (Ferguson *et al.*, 1988; Homans *et al.*, 1988; Gerber *et al.*, 1992; Sipos *et al.*, 1994; Orlean & Menon, 2007). Este tipo de anclaje, cuya estructura interna básica incluye una molécula de etanolamina fosfato, un complejo trimanósido, una molécula de glucosamina y otra de inositol fosfato en este orden (Figura 23) (Fankhauser *et al.*, 1993; Ikezawa, 2002; Imhof *et al.*, 2004), es utilizado por la mayoría de los eucariotas para expresar y localizar proteínas en la superficie celular (Englund, 1993; McConville & Ferguson, 1993). En el caso de *S. cerevisiae* y de otras levaduras, una pequeña parte del total de proteínas GPI translocadas a la periferia celular permanece unida permanentemente a la membrana plasmática, mientras que la gran mayoría es sometida a un procesamiento posterior capaz de integrarlas en sitios específicos de la pared celular mediante la unión covalente a la fracción glucano de la misma (Kapteyn *et al.*, 1999; Mayor & Riezman, 2004; Pittet & Conzelmann, 2007). Para demostrar que el mecanismo de acción de la toxina estaba mediado a través de una proteína GPI, se estudió un grupo de mutantes que tenían alterada la capacidad de biosíntesis de este sistema de anclaje proteico de acuerdo con las investigaciones previas realizadas por otros autores (Leidich & Orlean, 1996; Taron *et al.*, 2000). Todos los mutantes ensayados (*las21Δ*, *gwt1Δ*, *gpi8Δ*, *gpi10Δ*, *gpi13Δ*, *gpi14Δ*, *gpi16Δ* y *gpi19Δ*) mostraron un incremento significativo del nivel de resistencia al tratamiento con PMKT, acompañado de una reducción simultánea de la capacidad de unión de la toxina a células completas y a protoplastos (Tabla 11). Este hecho justificaría que la delección de estos genes relacionados con el anclaje GPI supone una reducción cuantitativa en el número de proteínas que actúan como receptor funcional de la toxina *killer*, tanto a nivel de la membrana plasmática como de la pared celular. Asimismo, podría indicar la implicación de dicha molécula en la acción de la toxina o también la existencia de un receptor unido a la periferia celular mediante este tipo de anclaje.



**Figura 23. Estructura interna básica del sistema de anclaje GPI determinada a partir del estudio de varias especies distintas de levaduras (Frankhauser *et al.*, 1993; Imhof *et al.*, 2004).** El sistema de anclaje incluye: una molécula de fosfatidil inositol, una molécula de glucosamina no acetilada (GlcN), tres residuos de manosa (Man 1-3) y una molécula de etanolamina fosfato. A cada una de las manosas se unen residuos de distinta naturaleza, cuya composición y distribución puede variar entre las distintas especies estudiadas (McConville & Ferguson, 1993). Por su particular interés en este trabajo, conviene destacar la naturaleza del residuo R<sub>1</sub>, manosa  $\alpha$  (1-2). El sistema GPI se encuentra anclado a la membrana plasmática a través de un diglicérido que está unido a la molécula de fosfatidil inositol. El extremo C-terminal de la proteína se une a la molécula de etanolamina fosfato. El tratamiento con PI-PLC (en rojo) cataliza la hidrólisis del enlace fosfato de la molécula de fosfatidil inositol en el complejo GPI.

Del grupo de genes comentado anteriormente, cuyas proteínas respectivas podían relacionarse directamente con la actividad de la toxina *killer* a nivel de la periferia celular (*LAS21*, *DFG5*, *CWP1* y *CWP2*, entre otros), el mutante de delección *cwp2* $\Delta$  fue el único completamente resistente al tratamiento con PMKT (Tabla 10), indicando que Cwp2p está probablemente implicado en el proceso de interacción con la toxina funcionando como un receptor. En el proceso de maduración de Cwp2p a lo largo de la ruta secretora de la levadura, la secuencia señal específica situada en el extremo C-terminal de la proteína es eliminada en su entrada al retículo endoplasmático y remplazada por un complejo GPI previamente sintetizado. Posteriormente, la proteína es transportada en vesículas hasta la membrana plasmática, donde se escinde la fracción lipídica del anclaje GPI para finalmente quedar unida de forma covalente a los (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -glucanos de la pared celular mediante un remanente GPI constituido únicamente por los residuos de manosa (Caras *et al.*, 1987; van der Vaart *et al.*, 1995; Kapteyn *et al.*, 1999b).

La proteína Cwp2p es uno de los principales componentes de la fracción manoproteica de la pared celular y juega un papel importante en la estabilización de su estructura (van der Vaart *et al.*, 1995) y en la protección celular frente al estrés provocado



por niveles bajos de pH (Skrzypek *et al.*, 1997, 2000). Ciertas cepas de *S. cerevisiae* denominadas SLC (*Sphingolipid Compensatory*) son incapaces de crecer en condiciones de pH ácido cuando carecen de esfingolípidos. Estudios llevados a cabo con variantes de estas cepas, Lpr<sup>R</sup>, portadoras del gen supresor *LPR* que permite el crecimiento a pH 4,1 en ausencia de esfingolípidos, demostraron que la capacidad de las cepas SLC para generar un flujo neto de salida de H<sup>+</sup> y regular así su pH intracelular dependía de la actividad del gen *CWP2* (Skrzypek *et al.*, 2000).

Por otro lado, *LAS21* (YJL062W) codifica una proteína localizada fundamentalmente en la membrana plasmática que es necesaria para el mantenimiento de la integridad de la pared celular (Toh-e & Oguchi, 1998; Benachour *et al.*, 1999). Está implicada en la síntesis del complejo GPI mediante la adición (actividad transferasa) de una molécula de etanolamina fosfato a la (1→6)- $\alpha$ -manosa que forma parte de la estructura interna básica de dicho complejo (Figura 23). Puesto que la unión covalente de las proteínas GPI a los (1→6)- $\beta$ -glucanos de la pared celular se lleva a cabo mediante un remanente constituido por estos residuos de manosa, cabría esperar la posible existencia de alteraciones en el anclaje de los (1→6)- $\beta$ -glucanos en el mutante *las21* $\Delta$ .

Teniendo en cuenta que los receptores primarios de PMKT son (1→6)- $\beta$ -glucanos (Santos *et al.*, 2000) y que los receptores secundarios parecen estar relacionados con GPI, las bases en el establecimiento de la resistencia de los mutantes *las21* $\Delta$  y *cwp2* $\Delta$  resulta evidente. A pesar de que sería necesario la realización de otros estudios más exhaustivos sobre el tema, los resultados obtenidos en el presente trabajo (Tablas 10 y 11) sugieren que tanto la forma madura como el precursor anclado a GPI de la proteína Cwp2p podrían estar implicados en el mecanismo de acción de PMKT, sobre todo porque, tanto células completas como protoplastos del mutante sensible *cwp2* $\Delta$ , mostraron una reducción significativa de su capacidad de unión a la toxina. Esta vinculación de la proteína Cwp2p al proceso de recepción de la toxina, ya sea en forma de precursor GPI o en su forma madura, podría quedar nuevamente justificada por los resultados siguientes: primero, que el resto de los protoplastos de mutantes específicos relacionados con la biosíntesis del sistema de anclaje GPI también mostraron una importante disminución de la capacidad de unión a la toxina (Tabla 11); segundo, que el pretratamiento de protoplastos de la cepa tipo con la fosfolipasa C específica de fosfatidil inositol (PI-PLC), que cataliza la hidrólisis del enlace fosfato de la molécula de fosfatidil inositol en el complejo GPI (Figura 23), provocó la anulación total de la capacidad de unión a PMKT; y tercero, que la incorporación de Cwp2p en la bicapa lipídica de liposomas contruidos artificialmente se correlacionó directamente con el aumento de permeabilidad tras la exposición a PMKT (Figura 17).

### 5.3.2. Caracterización de Cwp2p como receptor secundario de la toxina PMKT

Los resultados de los experimentos llevados a cabo en el presente estudio, en los que se ha comparado el perfil de resistencia/sensibilidad de la levadura sensible tipo con el de ciertos mutantes de delección para genes implicados en la biosíntesis del complejo GPI, han demostrado que las proteínas que incluyen este tipo de anclaje proteico en su estructura son capaces de conferir sensibilidad a la toxina PMKT (Tabla 11). Sin embargo, teniendo en cuenta el elevado número de proteínas que presentan el complejo GPI como sistema de anclaje a la periferia celular en levaduras (de Nobel & Lipke, 1994; van der Vaart *et al.*, 1997), resulta difícil demostrar de forma inequívoca la capacidad de Cwp2p para actuar como receptor funcional de la toxina, incluso a pesar de la completa falta de adsorción existente entre PMKT y los protoplastos de mutantes *cwp2Δ* (Tabla 11). Para comprobar esta posible interacción directa entre ambas proteínas, y con objeto de aislar y purificar el receptor de la toxina situado en la periferia de la célula, extractos de la pared celular y de la membrana plasmática de la levadura sensible tipo y del mutante *cwp2Δ* se sometieron a cromatografía de afinidad utilizando una matriz cromatográfica formada por pustulano y sepharosa 6B en la que previamente se había inmovilizado PMKT (Figuras 14 y 15). En el caso de la cepa sensible tipo, después de llevar a cabo la elución de las proteínas retenidas en la matriz, la resolución mediante PAGE-SDS de los extractos recogidos demostró la existencia de dos bandas diferentes: una de 18 kDa de masa molecular, directamente relacionada con la toxina PMKT (Santos & Marquina, 2004b), y otra de 180 kDa. Puesto que en el análisis simultáneo de los extractos proteicos procedentes del mutante *cwp2Δ* no se detectó la presencia de la banda de 180 kDa, se pudo llegar a la conclusión de que dicha banda podría corresponder a la proteína Cwp2p (Figura 14).

Como se ha comentado en el apartado 4.10, la comparación entre la masa molecular de la banda obtenida (180 kDa) y la masa molecular de la forma madura de Cwp2p (5,5 kDa) (Pallier *et al.*, 1993; van der Vaart *et al.*, 1995), calculada a partir de su secuencia aminoacídica (SGD) tras la eliminación del péptido señal y el procesamiento postraducciona, puso de manifiesto una substancial diferencia. Por ello, se hizo necesario confirmar la naturaleza de la proteína aislada mediante espectrometría de masas MALDI-TOF-MS. Después de analizar, tanto las alícuotas eluidas de la cromatografía de afinidad como las extraídas directamente a partir de la banda resuelta en PAGE-SDS, se pudo comprobar la presencia de un único pico de proteína de 11,7 kDa, de nuevo mayor que el valor estimado para la forma madura de Cwp2p. Estas diferencias podrían quedar justificadas por el grado de glicosidación de la proteína. En primer lugar, se ha descrito que la secuencia aminoacídica que constituye Cwp2p contiene múltiples residuos de treonina y

serina en la región C-terminal, lo que incrementa fuertemente la probabilidad de que presente un alto grado de O-glicosidación (Jentoft, 1990; van der Vaart *et al.*, 1995). En segundo lugar, el remanente GPI por el cual Cwp2p se haya anclada a la pared celular de la levadura está constituido por tres residuos de manosa centrales y varios residuos laterales entre los que se incluye una cuarta molécula de ese mismo azúcar (Fankhauser *et al.*, 1993; Imhof *et al.*, 2004; Pittet & Conzelmann, 2007). En este estado de unión a la pared, se ha comprobado que Cwp2p incluye también una cadena de (1→6)-β-glucano en su estructura (van der Vaart *et al.*, 1995). Además, el hecho de que Cwp2p posea un motivo de repetición específico tipo PIR en el extremo N-terminal de su secuencia aminoacídica (van der Vaart *et al.*, 1995) (SGD) podría justificar su capacidad de unión a (1→3)-β-glucanos a través de la formación de un enlace éster (Ecker *et al.*, 2006). La presencia de todos estos residuos glicosilados en Cwp2p podría incrementar la masa molecular de la proteína de forma substancial como para justificar las diferencias observadas entre la masa molecular de la secuencia de aminoácidos (SGD) y la determinada mediante espectrometría MALDI-TOF-MS. En el caso de la PAGE-SDS, el estado de glicosidación de la proteína interferiría en la capacidad de adsorción al SDS, por lo que el grado de desnaturalización del polipéptido y el aporte de carga negativa proporcional a la longitud de la cadena aminoacídica quedarían alterados. El resultado de todas estas modificaciones implica una disminución en la movilidad electroforética, habiéndose descrito este problema previamente en la caracterización de Cwp2p (van der Vaart *et al.*, 1995) y en la de otras muchas proteínas altamente glicosiladas (Brimer & Montie, 1998; Larsen *et al.*, 2004; Okuyama *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2007; Shibuya & Kikuchi, 2008).

Para correlacionar de forma directa la proteína co-eluida junto con PMKT en la cromatografía de afinidad y Cwp2p, se procedió a secuenciar el extremo amino-terminal. La secuenciación reveló una fuerte homología entre dicha proteína (masa molecular de 11,7 kDa estimada mediante MALDI-TOF-MS) y el producto génico del ORF YKL096W-A (CWP2), de acuerdo con lo publicado en SGD (Figura 16). Este hecho, unido a que al resolver los geles (PAGE-SDS) de los extractos de pared celular y membrana plasmática del mutante *cwp2Δ* no se detectó la banda de 180 kDa, corroboraría lo expuesto anteriormente y justificaría la posible función de la proteína Cwp2p como único receptor proteico de PMKT situado en la periferia celular de la levadura sensible. La localización preferente del receptor quedaría determinada por la diferencia de intensidad de las bandas proteicas presentes en los geles de poliacrilamida tras la realización de la PAGE-SDS (Figura 14). A pesar de que la mayoría de la proteína se encuentra anclada a la pared celular (van der Vaart *et al.*, 1995; 1997), donde podría jugar un papel importante en el proceso de unión de la toxina (apartado 5.3.3), una parte cuantitativamente menor se localizaría en la membrana plasmática

actuando igualmente como receptor secundario de PMKT. Esta proteína Cwp2p precursora, anclada a la membrana plasmática mediante una molécula GPI, jugaría un papel primordial en la actividad de la toxina como así lo demuestra el hecho de que las células tratadas con la enzima PI-PLC fueran resistentes a la toxina.

### 5.3.3. Interacción de Cwp2p y la toxina PMKT

Aunque los resultados obtenidos en el presente trabajo no han permitido la caracterización completa del proceso de interacción entre Cwp2p y la toxina PMKT, si se ha podido comprobar algunos de los hechos que constituyen el fundamento de dicha interacción. Primero, teniendo en cuenta que el tratamiento de los protoplastos de la célula sensible tipo con la enzima PI-PLC hizo que la sensibilidad a PMKT disminuyera significativamente y que su capacidad de unión a la toxina desapareciera por completo, se puede afirmar que la fracción lipídica (diacilglicérido) del anclaje GPI presente en el receptor localizado en la membrana plasmática no interviene en la interacción con la toxina (Figura 23). Segundo, el hecho de que tanto el precursor de Cwp2p anclado a GPI ubicado en la membrana plasmática como su forma madura, situada en la pared celular de la levadura sensible y desprovista de este sistema de anclaje proteico, fuesen capaces de unirse a la toxina *killer* (Figura 15), indicó que la fracción GPI no está directamente implicada en la unión. Tercero, si los protoplastos de la célula sensible tipo tratados con PI-PLC son resistentes a PMKT y el sistema de anclaje GPI no interviene en el proceso de adhesión a la toxina, el hecho de que el resultado de los experimentos llevados a cabo relacionen el mecanismo de acción de PMKT con la presencia del precursor GPI de Cwp2p podría quedar justificado si durante el procesamiento de dicha proteína a lo largo de la ruta secretora de la levadura existiese al menos un estado transitorio del complejo toxina-receptor localizado en la membrana plasmática o en sus proximidades. Cuarto, la existencia algún otro efector capaz de interaccionar simultáneamente o en etapas subsiguientes con Cwp2p y PMKT no se ha tenido en cuenta a la hora de diseñar un modelo para el mecanismo de acción específico de la toxina, ya que la inclusión de Cwp2p en la membrana lipídica de liposomas contruidos artificialmente con carboxifluoresceína en su interior fue suficiente por si sola para conferir sensibilidad a PMKT (liberación del fluoróforo al medio extracelular), comprobándose al mismo tiempo que los liposomas sin Cwp2p eran completamente resistentes (Figura 17).

En términos generales, se puede admitir que las proteínas que presentan un sistema de anclaje tipo GPI en su estructura resultan ser candidatas idóneas para la recepción de aquellas toxinas que son capaces de unirse a la superficie celular y desarrollar procesos de

oligomerización para formar canales como mecanismo de toxicidad específico. Esta afirmación podría quedar justificada, primero, por el hecho de que este tipo de proteínas están localizadas en la superficie externa de la membrana plasmática de la mayoría de las células eucariotas (Englund, 1993; McConville & Ferguson, 1993), y segundo, porque se ha comprobado que en dichas membranas las proteínas GPI muestran una mayor capacidad de movilidad lateral que aquellas que poseen dominios transmembrana en su estructura (Zhang *et al.*, 1992; Nelson *et al.*, 1997). Estas propiedades de las proteínas GPI resultan ser totalmente necesarias para el desarrollo de múltiples procesos biológicos, como por ejemplo la interacción del anticuerpo CAMPATH-1 con su antígeno específico (tipo GPI) localizado en la membrana de los linfocitos humanos (Xia *et al.*, 1993); la caracterización de Thy-1, una de las principales proteínas con anclaje GPI que está presente en la membrana de los linfocitos T de roedores y que actúa como receptor de la toxina aerolisina (Zhang *et al.*, 1992; Diep *et al.*, 1998; Mackenzie *et al.*, 1999); y el proceso de recepción de la toxina  $\alpha$  producida por *Clostridium septicum* (Gordon *et al.*, 1999). Además, Kre1p, el receptor secundario de la toxina K1 de *S. cerevisiae*, también se encuentra unido a la membrana plasmática mediante un anclaje tipo GPI (apartado 1.4.1) (Breinig *et al.*, 2002, 2004). En el caso de PMKT, la unión de la toxina al precursor GPI de Cwp2p podría favorecer la formación de un canal responsable de mediar las alteraciones en la homeostasis iónica en las células sensibles, de acuerdo con el mecanismo de acción propuesto previamente por nuestro grupo de investigación (Santos & Marquina, 2004a; Santos *et al.*, 2005), o facilitar, al menos, el proceso de inserción de la toxina en la bicapa lipídica.

En la determinación del proceso de interacción de PMKT con Cwp2p habría que tener en cuenta dos de las características de la proteína descritas anteriormente. Primero, que el extremo N-terminal de Cwp2p contiene una repetición PIR que probablemente no interviene en el proceso de unión a la toxina (Ecker *et al.*, 2006). Y segundo, que el extremo C-terminal posee múltiples residuos de treonina y serina que incrementan fuertemente la probabilidad de que posea un alto grado de glicosidación (Jentoft, 1990; van der Vaart *et al.*, 1995) y, en consecuencia, muchos grupos fosfodiéster. Por lo tanto, la explicación más sencilla para justificar la naturaleza de la interacción entre ambas proteínas sería que, a valores ácidos de pH, PMKT está cargada positivamente y es fuertemente atraída por la carga neta negativa que posee Cwp2p, que en su secuencia incluye seis residuos ácidos y residuos sin carga positiva (Figura 16) (Pallier *et al.*, 1993; van der Vaart *et al.*, 1995) (SGD).

Todos los resultados obtenidos en los diversos experimentos llevados a cabo para determinar la identidad del receptor de PMKT sugieren que las proteínas localizadas en la pared celular están directamente implicadas en el mecanismo de acción de la toxina. Esta conclusión estaría de acuerdo con los resultados publicados previamente por nuestro equipo

(Santos *et al.*, 2000) en los que, como primera barrera externa en la periferia de la levadura, la pared celular permitiría la unión rápida de PMKT y favorecería su acumulación en la superficie celular. La presencia de los (1→6)- $\beta$ -glucanos en la pared resultó ser determinante para la actividad de la toxina, actuando como receptor primario (Santos *et al.*, 2000). Teniendo en cuenta que la forma madura de Cwp2p se encuentra unida a este tipo de polímeros (var der Vaart *et al.*, 1995), es probable que esta unión constituya el mecanismo por el cual la toxina entra en contacto con su receptor secundario localizado en la pared celular (Cwp2p). Asimismo, esta interacción de PMKT con la forma madura de Cwp2p podría favorecer posteriormente su adhesión al precursor Cwp2p tipo GPI localizado en la membrana plasmática o sus proximidades. Finalmente, la unión al precursor GPI-anclado de Cwp2p permitiría la aproximación suficiente de PMKT a la membrana plasmática como para mediar su interacción con ella a través de un proceso aún no conocido y facilitar así el desarrollo de su mecanismo de acción específico (Figura 24).

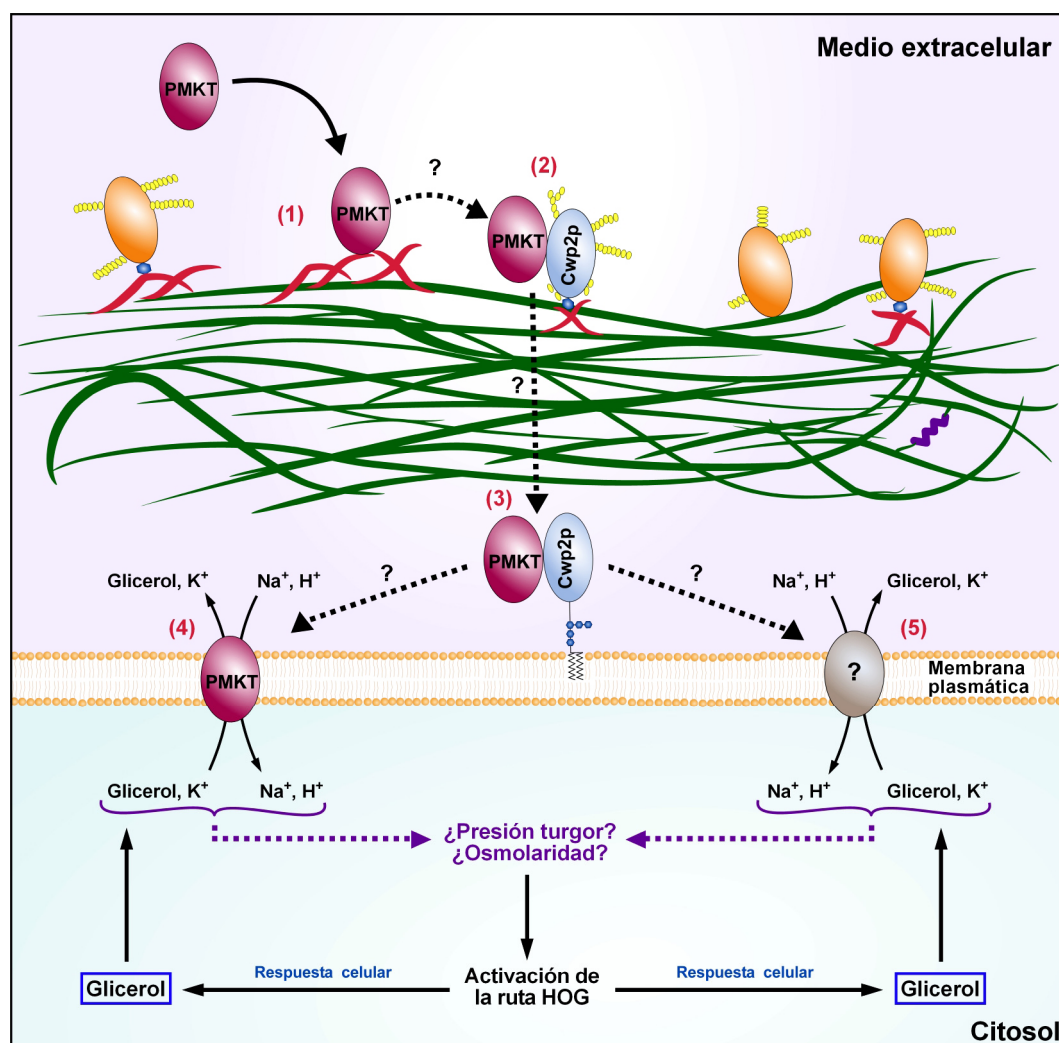
El desarrollo de los experimentos llevados a cabo en el presente trabajo ha permitido la identificación y caracterización preliminar de un grupo de mutantes resistentes al tratamiento con PMKT, muchos de ellos relacionados con la biosíntesis del sistema de anclaje GPI. La unión de la toxina al precursor de Cwp2p, adherido a la membrana plasmática mediante este tipo de anclaje, podría aportar algunas de las claves necesarias para el correcto entendimiento de la interacción de la toxina con sus receptores desde el punto de vista estructural. La realización de experimentos adicionales dirigidos a medir la afinidad de PMKT por Cwp2p y las posibles modificaciones estructurales del sistema GPI, así como la resolución de la conformación de este complejo toxina-receptor, podrían resultar de gran utilidad para el entendimiento global del mecanismo de acción de PMKT.

La construcción de la proteína de fusión GFP-Cwp2p y su expresión en células sensibles completas, así como el estudio de microscopía de fluorescencia llevado a cabo tras el tratamiento de dichas células con la toxina PMKT en presencia de yoduro de propidio, corroboró de forma directa algunas de las afirmaciones propuestas anteriormente. La señal fluorescente de la proteína de fusión permitió confirmar que Cwp2p se encuentra localizada en la periferia de las células sensibles durante todo el proceso mediado por la toxina (Figura 18), de acuerdo con su capacidad para actuar como receptor. Asimismo, la utilización de GFP-Cwp2p sirvió para verificar la correcta incorporación de Cwp2p en las membranas lipídicas de liposomas artificiales. El estudio de sensibilidad a PMKT llevado a cabo mediante la determinación del porcentaje de células teñidas con yoduro de propidio tras el tratamiento con la toxina (Figura 18) reveló que la permeabilización de la membrana plasmática a este colorante tiene lugar aproximadamente tres horas después de que el proceso de muerte celular pueda ser detectado mediante el recuento de células viables en

placa (Figura 10). Este hecho estaría de acuerdo con los resultados previos obtenidos (Santos & Marquina, 2004a), donde las alteraciones derivadas de la pérdida de integridad física de la membrana plasmática de la célula sensible parecían ser la última consecuencia del proceso de intoxicación mediado por PMKT. De este modo, la acidificación del pH intracelular y los flujos netos de salida de iones  $K^+$  y entrada de iones  $Na^+$ , detectados durante la primera hora de tratamiento con la toxina y debidos a la formación de canales iónicos no regulados en la membrana (Santos & Marquina, 2004a), irían seguidos de la pérdida de otros metabolitos y moléculas de alto peso molecular como resultado de la formación de poros (canales no selectivos) de mayor tamaño en la membrana plasmática de la levadura sensible (Kagan, 1983; Kurzweilová & Sigler, 1995; Santos & Marquina, 2004a). Dependiendo del diámetro de dichos poros, la capacidad de las distintas sustancias para atravesar la membrana será diferente y, en consecuencia, las observaciones realizadas también lo serían (flujos de iones, metabolitos y colorantes vitales). En este sentido, al menos durante las primeras etapas de su acción citotóxica, la toxina PMKT parece mostrar ciertas similitudes con la actividad fungicida de la histatina 5 en levaduras pertenecientes al género *Candida*, que induce la despolarización de la membrana plasmática (Ruissen *et al.*, 2001) y pérdidas de ATP y potasio intracelular (Xu *et al.*, 1999; Koshlukova *et al.*, 2000). Estas alteraciones, mediadas por la aparición de poros en la membrana plasmática, se corroboraron observando la presencia de células teñidas con yoduro de propidio (Helmerhorst *et al.*, 1999), colorante de masa molecular baja (668,4 Da), pero no con el uso de otros marcadores de mayor tamaño como la calceína-acetoximetil-éster (994,9 Da) (Edgerton *et al.*, 1998). Por lo tanto, la pérdida de integridad celular debida a PMKT sería una consecuencia última de la acción citotóxica y no una acción primaria de la toxina sobre membrana plasmática, de acuerdo con los resultados previos obtenidos por nuestro grupo de investigación mediante citometría de flujo (Santos & Marquina, 2004a).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo aportan una información de gran utilidad para la caracterización del mecanismo de acción de la toxina PMKT de *P. membranifaciens* CYC 1106. En principio, la respuesta transcripcional y celular asociada a la acción citotóxica de dicha toxina en *S. cerevisiae* se corresponde de forma directa con las alteraciones del gradiente electroquímico de la membrana plasmática observadas previamente (Santos *et al.*, 2000, Santos & Marquina, 2004a, 2004b). Estas alteraciones podrían actuar como desencadenante de la cascada de transducción de señales denominada HOG, en la que la inducción de la síntesis de glicerol podría ir encaminada a contrarrestar a corto plazo los efectos nocivos de la toxina sobre la homeostasis iónica. Todas estas observaciones corroboran la idea de que el efecto inducido por el tratamiento con PMKT supone, entre otros posibles efectos, un aumento de la permeabilidad de la

membrana plasmática en la célula sensible, de forma similar al mecanismo de acción específico ejercido por la toxina K1 de *S. cerevisiae* (de la Peña *et al.*, 1981; Kagan, 1983; Martinac *et al.*, 1990). Otros estudios complementarios deberían realizarse en el futuro para profundizar en el entendimiento del mecanismo de acción de PMKT y para conseguir mayor información acerca de sus propiedades bioquímicas, sobre todo de cara al desarrollo de nuevas aplicaciones en campos como la biotecnología, la agrobiología o la medicina, complementarias a las ya estudiadas (Santos *et al.*, 2004; Santos & Marquina, 2004b).



**Figura 24. Mecanismo de acción propuesto para PMKT. Papel de la proteína Cwp2p y su precursor anclado a GPI en la actividad de la toxina.** El proceso comienza con la unión de la toxina a su receptor primario localizado en la pared celular de la levadura sensible, los (1→6)-β-glucanos (1). Por un proceso aún no conocido, la toxina entraría en contacto con la forma madura de Cwp2p que se encuentra unida a los (1→6)-β-glucanos (2), favoreciéndose posteriormente la adhesión a su precursor anclado a GPI localizado en la membrana plasmática o en sus proximidades (3). La unión al precursor GPI-anclado de Cwp2p permitiría la aproximación suficiente de PMKT a la membrana plasmática como para mediar su interacción con ella y facilitar así el desarrollo de su mecanismo de acción específico. Este proceso de interacción podría implicar la formación de canales catiónicos transmembrana por inserción directa de PMKT en la membrana plasmática (4) o la formación de estos canales a través de un proceso aún no caracterizado (oligomerización de la toxina, intervención del precursor de Cwp2p GPI-anclado o algunas de sus partes en la formación del canal, etc.) (5). Tras su aplicación, PMKT induce el paso de ciertos iones fisiológicos ( $H^+$ ,  $K^+$  y  $Na^+$ ) y metabolitos de bajo peso molecular (ej: glicerol) a través de la membrana plasmática (Santos & Marquina, 2004a), lo que desencadena el proceso de muerte celular. Estas alteraciones son detectadas por la célula sensible a través de un mecanismo desconocido (ej: cambios en la presión de turgor o alteraciones del nivel de osmolaridad intracelular) que desencadena una respuesta transcripcional mediada por la activación de la ruta HOG (acumulación de glicerol).



## ***6 CONCLUSIONES***

1. La exposición de las levaduras sensibles a la toxina PMKT de *P. membranifaciens* desencadena una respuesta transcripcional fundamentalmente basada en la expresión de genes que codifican proteínas implicadas en la adaptación a estrés osmótico, como ciertos transportadores y enzimas involucradas en el mantenimiento de la homeostasis celular.

2. La sobreexpresión de genes como *ENA1*, *NHA1* y *TRK2* parece indicar que la respuesta celular iría encaminada a compensar las alteraciones provocadas por el desequilibrio en las concentraciones de iones intracelulares debidas a la acción de la toxina.

3. La respuesta transcripcional a PMKT también implicó un aumento muy significativo de la expresión de ciertos genes, como *GPD1*, *GPP2* y *GLK1*, relacionados con la biosíntesis de glicerol, un metabolito osmóticamente compatible cuya acumulación intracelular pudo demostrarse experimentalmente durante las primeras etapas de la acción citotóxica. En estadios posteriores se pudo determinar una disminución de los niveles de glicerol acumulado y su salida al medio extracelular, generándose un estímulo continuo en la célula sensible que se correlacionó con una activación permanente de la ruta HOG de transducción de señales, determinada a su vez por la fosforilación de la proteína Hog1p.

4. La acción de la toxina desencadenó adicionalmente una respuesta general a estrés que supuso un aumento en la transcripción de diversos genes que codifican para proteínas de choque térmico, la mayoría de ellas no implicadas en la respuesta a estrés hiperosmótico. Este hecho indicaría la existencia de un grupo de proteínas de choque térmico que mediarían específicamente en la respuesta a PMKT de forma complementaria a las inducidas propiamente por ruta HOG (*HSP12* y *HSP26*).

5. De forma general, pudo establecerse una relación directa entre el nivel de inducción de los genes sobreexpresados y la presencia de fenotipos hipersensibles en los mutantes estudiados. Complementariamente, se pudo determinar que el mutante *hog1Δ* presentó una elevada hipersensibilidad a PMKT, indicando que existe una respuesta coordinada en las células sensibles como mecanismo de protección ante los efectos deletéreos de la toxina.

6. Los mutantes de delección para genes no esenciales que codifican proteínas localizadas o relacionadas con la periferia celular presentaron una resistencia variable al tratamiento con PMKT. Solo un grupo reducido de esos mutantes, entre ellos los implicados en la síntesis y el procesamiento del anclaje GPI, presentó un incremento significativo de su

resistencia acompañado de una reducción simultánea de la capacidad de unión de la toxina, tanto a células completas como a protoplastos. El mutante *cwp2Δ* fue el único totalmente resistente al tratamiento con PMKT, indicando que la proteína Cwp2p está probablemente implicada en el proceso de interacción con la toxina funcionando como un receptor.

7. La interacción directa entre PMKT y Cwp2p se pudo determinar mediante cromatografía de afinidad y posterior análisis de las fracciones eluidas. En extractos de pared celular y membrana plasmática se pudo comprobar la existencia de una proteína de 11.7 kDa capaz de unirse a la toxina, que mediante la secuenciación de su extremo amino-terminal presentó una elevada homología con la secuencia de la proteína Cwp2p. La ausencia de dicha proteína en extractos celulares obtenidos del mutante *cwp2Δ* corroboraría lo expuesto anteriormente y justificaría la posible función de Cwp2p como único receptor proteico de PMKT situado en la periferia celular.

8. El tratamiento con fosfolipasa C específica de fosfatidil inositol, unido a la resistencia mostrada por los mutantes defectivos en el anclaje GPI, determinó que la acción citotóxica de la toxina requiere en la periferia celular la presencia de un receptor anclado a la membrana plasmática mediante una molécula de este tipo. Tanto el precursor de Cwp2p como su forma madura fueron capaces de unirse a la toxina, lo que indicó que la fracción GPI no está directamente implicada en la unión y que ambas formas son necesarias para la acción de la toxina.

9. La utilización de liposomas permitió determinar que la toxina PMKT no es capaz de interaccionar directamente con la bicapa lipídica, observándose este hecho sólo cuando la proteína Cwp2p se encuentra integrada en la misma. La detección de la señal fluorescente de la proteína de fusión GFP-Cwp2p sirvió para verificar la incorporación del receptor en las membranas lipídicas de los liposomas artificiales, así como para confirmar que Cwp2p se encuentra localizada en la periferia de las células sensibles durante todo el proceso de intoxicación mediado por la toxina.

Todas las observaciones realizadas corroborarían la idea de que el efecto inducido por PMKT supone un aumento de la permeabilidad de la membrana plasmática en la célula sensible, mediada por la interacción de la toxina con sus receptores específicos presentes en la periferia celular. En el presente trabajo se ha descrito la existencia de una respuesta transcripcional y celular asociada a dicho proceso, en el que las alteraciones derivadas de la pérdida de integridad física de la membrana plasmática parecen ser la última consecuencia.

## ***7 BIBLIOGRAFÍA***

- Adler A, Hidalgo-Grass C, Boekhout T, Theelen B, Sionov E & Polacheck I (2007) *Pichia farinosa* bloodstream infection in a lymphoma patient. *J Clin Microbiol.* **45**: 3456-3458.
- Agarwal AK, Rogers PD, Baerson SR, Jacob MR, Barker KS, Cleary JD, Walker LA, Nagle DG & Clark AM (2003) Genome-wide expression profiling of the response to polyene, pyrimidine, azole, and echinocandin antifungal agents in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* **278**: 34998-35015.
- Ahmed A, Sesti F, Ilan N, Shih TM, Sturley SL & Goldstein SAN (1999) A molecular target for viral killer toxin: TOK1 potassium channels. *Cell.* **99**: 283-291.
- Al-Aidroos K & Bussey H (1978) Chromosomal mutants of *Saccharomyces cerevisiae* affecting the cell wall binding site for killer factor. *Can J Microbiol.* **24**: 228-237.
- Albertyn J, Hohmann S, Thevelein JM & Prior BA (1994) GPD1, which encodes glycerol-3-phosphate dehydrogenase, is essential for growth under osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*, and its expression is regulated by the high-osmolarity glycerol response pathway. *Mol Cell Biol.* **14**: 4135-4144.
- Alepuz PM, Cunningham KW & Estruch F (1997) Glucose repression affects ion homeostasis in yeast through the regulation of the stress-activated ENA1 gene. *Mol Microbiol.* **26**: 91-98.
- Alepuz PM, de Nadal E, Zapater M, Ammerer G & Posas F (2003) Osmostress-induced transcription by Hot1 depends on a Hog1-mediated recruitment of the RNA Pol II. *EMBO J.* **22**: 2433-2442.
- Alepuz PM, Jovanovic A, Reiser V & Ammerer G (2001) Stress-induced map kinase Hog1 is part of transcription activation complexes. *Mol Cell.* **7**: 767-777.
- Alexander MR, Tyers M, Perret M, Craig BM, Fang KS & Gustin MC (2001) Regulation of cell cycle progression by Swe1p and Hog1p following hypertonic stress. *Mol Biol Cell.* **12**: 53-62.
- Alexandre H, Ansanay-Galeote V, Dequin S & Blondin B (2001) Global gene expression during short-term ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **498**: 98-103.
- Ali R, Brett CL, Mukherjee S & Rao R (2004) Inhibition of sodium/proton exchange by a Rab-GTPase-activating protein regulates endosomal traffic in yeast. *J Biol Chem.* **279**: 4498-4506.
- Aliouat EM, Cailliez JC, Séguy N, Dei-Cas E, Polonelli L, Gerloni M, Conti S & Camus D (1993) Inhibitory effect of a yeast killer toxin to the *in vitro* *Pneumocystis carinii* attachment. *Serodiagn Immunother Infect Dis.* **5**: 102-106.
- Alonso-Monge R, Navarro-Garcia F, Roman E, Negredo AI, Eisman B, Nombela C & Pla J (2003) The Hog1 mitogen-activated protein kinase is essential in the oxidative stress response and chlamydospore formation in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell.* **2**: 351-361.
- Ambesi A, Miranda M, Petrov VV & Slayman CW (2000) Biogenesis and function of the yeast plasma-membrane H(+)-ATPase. *J Exp Biol.* **203**: 155-160.

- Anaissie E, Bodey GP, Kantarjian H, Ro J, Vartivarian SE, Hopfer R, Hoy J & Rolston K (1989) New spectrum of fungal infections in patients with cancer. *Rev Infect Dis.* **11**: 369-378.
- Ancasi EG, Carrillo L & Benítez Ahrendts MR (2006) Moulds and yeasts in bottled water and soft drinks. *Rev Argent Microbiol.* **38**: 93-96.
- Ansell R & Adler L (1999) The effect of iron limitation on glycerol production and expression of the isogenes for NAD(+)-dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **461**: 173-177.
- Ansell R, Granath K, Hohmann S, Thevelein JM & Adler L (1997) The two isoenzymes for yeast NAD+-dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase encoded by GPD1 and GPD2 have distinct roles in osmoadaptation and redox regulation. *EMBO J.* **16**: 2179-2187.
- Aranda A, Querol A & del Olmo M (2002) Correlation between acetaldehyde and ethanol resistance and expression of HSP genes in yeast strains isolated during the biological aging of sherry wines. *Arch Microbiol.* **177**: 304-312.
- Araújo C, Sousa MJ, Ferreira MF & Leão C (2003) Activity of essential oils from Mediterranean Lamiaceae species against food spoilage yeasts. *J Food Prot.* **66**: 625-632.
- Armstrong WM & Rothstein A (1967) Discrimination between alkali metal cations by yeast. II. Cation interactions in transport. *J Gen Physiol.* **50**: 967-988.
- Attfield PV (1987) Trehalose accumulates in *Saccharomyces cerevisiae* during exposure to agents that induce heat shock response. *FEBS Lett.* **225**: 259-263.
- Auesukaree C, Homma T, Kaneko Y & Harashima S (2003) Transcriptional regulation of phosphate-responsive genes in low-affinity phosphate-transporter-defective mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun.* **306**: 843-850.
- Banuett F (1998) Signalling in the yeasts: an informational cascade with links to the filamentous fungi. *Microbiol Mol Biol Rev.* **62**: 249-274.
- Barnett JA, Payne RW & Yarrow D (1990) *Pichia membranaefaciens* Hansen. In: Barnett JA, Payne RW & Yarrow D (eds.) *Yeasts: Characteristics and Identification* (2<sup>nd</sup> edition). Cambridge University Press, Cambridge, pp. 503-504.
- Bañuelos MA, Sychrová H, Bleykasten-Grosshans C, Souciet JL & Potier S (1998) The Nha1 antiporter of *Saccharomyces cerevisiae* mediates sodium and potassium efflux. *Microbiology.* **144**: 2749-2758.
- Barandica JM, Santos A, Marquina D, López F, Acosta FJ & Peinado JM (1999) A mathematical model for toxin accumulation by killer yeast based on the yeast population growth. *J Appl Microbiol.* **86**: 805-811.
- Becerra M, Lombardía LJ, González-Siso MI, Rodríguez-Belmonte E, Hauser NC & Cerdán ME (2003) Genome-wide analysis of the yeast transcriptome upon heat and cold shock. *Comp Funct Genomics.* **4**: 366-375.

- Becker J & Craig EA (1994) Heat-shock proteins as molecular chaperones. *Eur J Biochem.* **219**: 11-23.
- Beever RE, Larcy EP & Pak HA (1989) Strains of *Botrytis cinerea* resistant to dicarboxymide and benzimidazole fungicides in New Zealand vineyards. *Plant Pathol.* **38**: 427-437.
- Belazzi T, Wagner A, Wieser R, Schanz M, Adam G, Hartig A & Ruis H (1991) Negative regulation of transcription of the *Saccharomyces cerevisiae* catalase T (CTT1) gene by cAMP is mediated by a positive control element. *EMBO J.* **10**: 585-592.
- Belli G, Gari E, Aldea M & Herrero E (2001) Osmotic stress causes a G(1) cell cycle delay and downregulation of Cln3/Cdc28 activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol.* **39**: 1022-1035.
- Benachour A, Sipos G, Flury I, Reggiori F, Canivenc-Gansel E, Vionnet C, Conzelmann A & Benghezal M (1999) Deletion of GPI7, a yeast gene required for addition of a side chain to the glycosylphosphatidylinositol (GPI) core structure, affects GPI protein transport, remodelling, and cell wall integrity. *J Biol Chem.* **274**: 15251-15261.
- Benghezal M, Benachour A, Rusconi S, Aebi M & Conzelmann A (1996) Yeast Gpi8p is essential for GPI anchor attachment onto proteins. *EMBO J.* **23**: 6575-6583.
- Benito B, Garciadeblas B & Rodriguez-Navarro A (2002) Potassium- or sodium-efflux ATPase, a key enzyme in the evolution of fungi. *Microbiology.* **148**: 933-941.
- Bentley NJ, Fitch IT & Tuite MF (1992) The small heat-shock protein Hsp26 of *Saccharomyces cerevisiae* assembles into a high molecular weight aggregate. *Yeast.* **8**: 95-106.
- Bergman MM, Gagnon D & Doern GV (1998) *Pichia ohmeri* fungemia. *Diagn Microbiol Infect Dis.* **30**: 229-231.
- Bertl A, Ramos J, Ludwig J, Lichtenberg-Fraté H, Reid J, Bihler H, Calero F, Martínez P & Ljungdahl PO (2003) Characterization of potassium transport in wild-type and isogenic yeast strains carrying all combinations of *trk1*, *trk2* and *tok1* null mutations. *Mol Microbiol.* **47**: 767-780.
- Bevan EA, Herring AJ & Mitchell DJ (1973) Preliminary characterization of two species of dsRNA in yeast and their relationship to the "killer" character. *Nature.* **245**: 81-86.
- Bhadra B, Rao RS, Kumar NN, Chaturvedi P, Sarkar PK & Shivaji S (2007) *Pichia cecembensis* sp. nov. isolated from a papaya fruit (*Carica papaya* L., *Caricaceae*). *FEMS Yeast Research.* **7**: 579-584.
- Biely P (1978) Changes in the rate of synthesis of wall polysaccharides during the cell cycle of yeast. *Arch Microbiol.* **119**: 213-214.
- Bienz M & Pelham HRB (1987) Mechanisms of heat shock activation in higher eukaryotes. *Adv Genet.* **24**: 31-72.

- Bihler H, Gaber RF, Slayman CL & Bertl A (1999) The presumed potassium carrier Trk2p in *Saccharomyces cerevisiae* determines an H<sup>+</sup>-dependent, K<sup>+</sup>-independent current. *FEBS Lett.* **447**: 115-120.
- Bilsland E, Molin C, Swaminathan S, Ramne A & Sunnerhagen P (2004) Rck1 and Rck2 MAPKAP kinases and the HOG pathway are required for oxidative stress resistance. *Mol Microbiol.* **53**: 1743-1756.
- Bilsland-Marchesan E, Arino J, Saito H, Sunnerhagen P & Posas F (2000) Rck2 kinase is a substrate for the osmotic stress-activated mitogen-activated protein kinase Hog1. *Mol Cell Biol.* **20**: 3887-3895.
- Birnboim HC & Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**: 1513-1523.
- Blomberg A (1995) Global changes in protein synthesis during adaptation of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* to 0.7 M NaCl. *J Bacteriol.* **177**: 3563-3572.
- Blomberg A (2000) Metabolic surprises in *Saccharomyces cerevisiae* during adaptation to saline conditions: questions, some answers and a model. *FEMS Microbiol Lett.* **182**: 1-8.
- Blomberg A & Adler L (1992) Physiology of osmotolerance in fungi. *Adv Microb Physiol.* **33**: 145-212.
- Bookout AL & Mangelsdorf DJ (2003) Quantitative real-time PCR protocol for analysis of nuclear receptor signaling pathways. *NRS.* **1**: 1-7.
- Boone C, Sommer SS, Hensel A & Bussey H (1990) Yeast *KRE* genes provide evidence for a pathway of cell wall  $\beta$ -glucan assembly. *J Cell Biol.* **110**: 1833-1843.
- Borkovich KA, Farrelly FW, Finkelstein DB, Taulien J & Lindquist S (1989) Hsp82 is an essential protein that is required in higher concentrations for growth of cells at higher temperatures. *Mol Cell Biol.* **9**: 3919-3930.
- Borst-Pauwels, G (1981) Ion transport in yeast. *Biochim Biophys Acta.* **650**: 88-127.
- Bortol A, Nudel C, Fraile E, De Torres R, Giuletti A, Spencer JF & Spencer D (1986) Isolation of yeast with killer activity and its breeding with an industrial baking strain by protoplast fusion. *Appl Microbiol Biotechnol.* **24**: 414-416.
- Bostian KA, Elliot Q, Bussey H, Burn V, Smith A & Tipper DJ (1984) Sequence of the preprotoxin dsRNA gene of type I killer yeast: multiple processing events produce a two-component toxin. *Cell.* **36**: 741-751.
- Bostian KA, Hopper JE, Rogers DT & Tipper D (1980) Translational analysis of the killer-associated virus-like particle dsRNA genome of *Saccharomyces cerevisiae*: M-ds RNA encodes toxin. *Cell.* **19**: 403-414.
- Bostian KA, Jayachandran S & Tipper DJ (1983) A glycosylated protoxin in killer yeast: models for its structure and maturation. *Cell.* **32**: 169-180.
- Boy-Marcotte E, Lagniel G, Perrot M, Bussereau F, Boudsocq A, Jacquet M & Labarre J (1999) The heat shock response in yeast: differential regulations and contributions of the Msn2p/Msn4p and Hsf1p regulons. *Mol Microbiol.* **33**: 274-283.



- Breinig F, Sendzik T, Eisfield K & Schmitt M (2006) Dissecting toxin immunity in virus-infected killer yeast uncovers an intrinsic strategy of self-protection. *PNAS*. **103**: 3810-3815.
- Breinig F, Schleinkofer K & Schmitt MJ (2004) Yeast Kre1p is GPI-anchored and involved in both cell wall assembly and architecture. *Microbiology*. **150**: 3209-3218.
- Breinig F, Tipper DJ & Schmitt MJ (2002) Krep1, the plasma membrane receptor for the yeast K1 viral toxin. *Cell*. **108**: 395-405.
- Brett CL, Tukaye DN, Mukherjee S & Rao R (2005) The yeast endosomal Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger Nhx1 regulates cellular pH to control vesicle trafficking. *Mol Biol Cell*. **16**: 1396-1405.
- Brewster JL, de Valoir T, Dwyer ND, Winter E & Gustin MC (1993) An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science*. **259**: 1760-1763.
- Brimer CD & Montie TC (1998) Cloning and comparison of fliC genes and identification of glycosylation in the flagellin of *Pseudomonas aeruginosa* a-type strains. *J Bacteriol*. **180**: 3209-3217.
- Brombacher K, Fischer BB, Rüfenacht K & Eggen RI (2006) The role of Yap1p and Skn7p-mediated oxidative stress response in the defence of *Saccharomyces cerevisiae* against singlet oxygen. *Yeast*. **23**: 741-750.
- Bruenn JA (1980) Virus-like particles of yeast. *Annu Rev Microbiol*. **34**: 49-68.
- Buck KW (1980) Viruses and killer factors of fungi. In: Gooday GW, Lloyd D & Trinci APG (eds.) *The Eukaryotic Microbiol Cell*. Cambridge Univ., England, pp. 329-375.
- Bukau B & Horwich AL (1998) The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell*. **92**: 351-366.
- Bun-Ya M, Nishimura M, Harashima S & Oshima Y (1991) The PHO84 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes an inorganic phosphate transporter. *Mol Cell Biol*. **11**: 3229-3238.
- Bun-ya M, Shikata K, Nakade S, Yompakdee C, Harashima S & Oshima Y (1996) Two new genes, PHO86 and PHO87, involved in inorganic phosphate uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet*. **29**: 344-351.
- Burnie JP, Carter TL, Hodgetts SJ & Matthews RC (2006) Fungal heat-shock proteins in human disease. *FEMS Microbiol Rev*. **30**: 53-88.
- Bush GL & Meyer DI (1996) The refolding activity of the yeast heat shock proteins Ssa1 and Ssa2 defines their role in protein translocation. *J Cell Biol*. **135**: 1229-1237.
- Bussey H (1991) K1 killer toxin, a pore forming protein from yeast. *Mol Microbiol*. **5**: 2339-2343.
- Bussey H (1974) Yeast killer factor-induced turbidity changes in cells and sphaeroplasts of a sensitive strain. *J Gen Microbiol*. **82**: 171-179.

- Bussey H, Sacks W, Galley D & Saville D (1982) Yeast killer plasmids mutations affecting toxin secretion and activity and toxin immunity function. *Mol Cell Biol.* **2**: 346-354.
- Bussey H, Saville D, Hutchins K & Palfree RG (1979) Binding of yeast killer toxin to a cell wall receptor on sensitive *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* **140**: 888-892.
- Bussey H & Sherman D (1973) Yeast killer factor: ATP leakage and coordinate inhibition of macromolecular synthesis in sensitive cells. *Biochim Biophys Acta.* **298**: 868-875.
- Bussey H & Skipper N (1975) Membrane-mediated killing of *Saccharomyces cerevisiae* by glycoproteins from *Torulopsis glabrata*. *J Bacteriol.* **10**: 476-483.
- Bussey H, Steinmetz O & Saville D (1983) Protein secretion in yeast: two chromosomal mutants that oversecrete killer toxin in *S. cerevisiae*. *Curr Genet.* **7**: 449-456.
- Bustin SA (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol.* **25**: 169-193.
- Butler AR, White JH & Stark MJR (1991) Analysis of the response of *Saccharomyces cerevisiae* cells to *Kluyveromyces lactis* toxin. *J Gen Microbiol.* **137**: 1749-1757.
- Buzzini P, Corazzi L, Turchetti B, Buratta M & Martini A (2004a) Characterization of the in vitro antimycotic activity of a novel killer protein from *Williopsis saturnus* DBVPG 4561 against emerging pathogenic yeasts. *FEMS Microbiol Lett.* **238**: 359-365.
- Buzzini P & Martini A (2001) Discrimination between *Candida albicans* and other pathogenic species of the genus *Candida* by their differential sensitivities to toxins of a panel of killer yeasts. *J Clin Microbiol.* **39**: 3362-3364.
- Buzzini P, Turchetti B & Martini A (2004b) Assessment of discriminatory power of three different fingerprinting methods based on killer toxin sensitivity for the differentiation of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *J Appl Microbiol.* **96**: 1194-1201.
- Cailliez JC, Séguy N, Aliouat EM, Polonelli L, Camus D & Dei-Cas E (1994) The yeast killer phenomenon: a hypothetical way to control *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Med Hypoth.* **43**: 167-171.
- Cansado J, Velázquez JB, Calo P, Sierio C, Longo E & Villa TG (1992) Characterization of killer-resistant strains of *Saccharomyces cerevisiae* isolated from spontaneous fermentations. *FEMS Microbiol Lett.* **76**: 13-17.
- Caprilli F, Prignano G, Latella C & Tavarozzi S (1985) Amplification of the killer system for differentiation of *Candida albicans* strains. *Mykosen.* **28**: 569-573.
- Caras IW, Weddell GN, Davitz MA, Nussenzweig V & Martin DW Jr. (1987) Signal for attachment of a phospholipid membrane anchor in decay accelerating factor. *Science.* **238**: 1280-1283.
- Carmel-Harel O, Stearman R, Gasch AP, Botstein D, Brown PO & Storz G (2001) Role of thioredoxin reductase in the Yap1p-dependent response to oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol.* **39**: 595-605.

- Caro LH, Tettelin H, Vossen JH, Ram AF, van Den Ende H & Klis FM (1997) In silico identification of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored plasma-membrane and cell wall proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. **13**: 1477-1489.
- Cashikar AG, Duennwald M & Lindquist SL (2005) A chaperone pathway in protein disaggregation. Hsp26 alters the nature of protein aggregates to facilitate reactivation by Hsp104. *J Biol Chem*. **280**: 23869-23875.
- Catty P, de Kerchove d'Exaerde A & Goffeau A (1997) The complete inventory of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* P-type transport ATPases. *FEBS Lett*. **409**: 325-332.
- Causton HC, Ren B, Koh SS, Harbison CT, Kanin E, Jennings EG, Lee TI, True HL, Lander ES & Young RA (2001) Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. *Mol Biol Cell*. **12**: 323-337.
- Cenci E, Bistoni F, Mencacci A, Perito S, Magliani W, Conti S, Polonelli L & Vecchiarelli A (2004) A synthetic peptide as a novel anticryptococcal agent. *Cell Microbiol*. **6**: 953-961.
- Cenci E, Mencacci A, Spreca A, Montagnoli C, Bacci A, Perruccio K, Velardi A, Magliani W, Conti S, Polonelli L & Romani L (2002) Protection of killer antiidiotypic antibodies against early invasive aspergillosis in a murine model of allogeneic T-cell-depleted bone marrow transplantation. *Infect Immun*. **70**: 2375-2382.
- Cerikcioglu N (2003) Medical importance of yeast killer toxin. *Mikrobiyol Bul*. **37**: 215-221.
- Chakrabarti A, Singh K, Narang A, Singhi S, Batra R, Rao KL, Ray P, Gopalan S, Das S, Gupta V, Gupta AK, Bose SM & McNeil MM (2001) Outbreak of *Pichia anomala* infection in the pediatric service of a tertiary-care center in Northern India. *J Clin Microbiol*. **39**: 1702-1706.
- Chen W-B, Han Y-F, Jong S-C & Chang S-C (2000) Isolation, purification, and characterization of a killer protein from *Schwanniomyces occidentalis*. *Appl Environ Microbiol*. **66**: 5348-5352.
- Choi MY, Kang GY, Hur JY, Jung JW, Kim KP & Park SH (2008) Analysis of Dual Phosphorylation of Hog1 MAP kinase in *Saccharomyces cerevisiae* using Quantitative Mass Spectrometry. *Mol Cells*. **26**: 200-205.
- Chowdhury S, Smith KW & Gustin MC (1992) Osmotic stress and the yeast cytoskeleton: phenotype-specific suppression of an actin mutation. *J Cell Biol*. **118**: 561-571.
- Cid VJ, Durán A, del Rey F, Snyder MP, Nombela C & Sánchez M (1995) Molecular basis of cell integrity and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev*. **59**: 345-386.
- Cobb MH & Goldsmith EJ (1995) How MAP kinases are regulated. *J Biol Chem*. **270**: 14843-14846.
- Cobb MH & Schaefer EM (1996) MAP kinase signaling pathways. *Pomega Notes Magazine*. **59**: 37-40.

- Comitini F, De Ingeniis J, Pepe L, Mannazzu I & Ciani M (2004) *Pichia anomala* and *Kluyveromyces wickerhamii* killer toxins as new tools against *Dekkera/Brettanomyces* spoilage yeasts. *FEMS Microbiol Lett.* **238**: 235-240.
- Conte A, Speranza B, Sinigaglia M & Del Nobile MA (2007) Effect of lemon extract on foodborne microorganisms. *J Food Prot.* **70**: 1896-1900.
- Cook JG, Bardwell L, Kron SJ & Thorner J (1996) Two novel targets of the MAP kinase Kss1p are negative regulators of invasive growth in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* **10**: 2831-2848.
- Cooper JA (1994) MAP kinase pathways. Straight and narrow or tortuous and intersecting? *Curr Biol.* **4**: 1118-1121.
- Corsetti A, Rossi J & Gobbetti M (2001) Interactions between yeasts and bacteria in the smear surface-ripened cheeses. *Int J Food Microbiol.* **69**: 1-10.
- Costenoble R, Valadi H, Gustafsson L, Niklasson C & Franzén CJ (2000) Microaerobic glycerol formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* **16**: 1483-1495.
- Craig E (1992) The heat shock response of *Saccharomyces cerevisiae*. In: Jones EW, Pringle JR & Broach JR (eds.) The molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: Gene expression. Cold Spring Harbor, NY, pp. 501-537.
- Crespo JL, Daicho K, Ushimaru T, Hall MN (2001) The GATA transcription factors GLN3 and GAT1 link TOR to salt stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* **276**: 34441-34444.
- Cyert MS, Kunisawa R, Kaim D & Thorner J (1991) Yeast has homologs (CNA1 and CNA2 gene products) of mammalian calcineurin, a calmodulin-regulated phosphoprotein phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **88**: 7376-7380.
- Dagert M & Ehrlich SD (1979) Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene.* **6**: 23-28.
- Dall'Acqua Coutinho S & Rodrigues Paula C (1998) Biotyping of *Malassezia pachydermatis* strains using the killer system. *Rev Iberoam Micol.* **15**: 85-87.
- D'Amore T, Crumplen R & Stewart GG (1991) The involvement of trehalose in yeast stress tolerance. *J Ind Microbiol.* **7**: 191-196.
- Daran JM, Dallies N, Thines-Sempoux D, Paquet V & Francois J (1995) Genetic and biochemical characterization of the UGP1 gene encoding the UDP-glucose pyrophosphorylase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem.* **233**: 520-530.
- Daran JM, Bell W & Francois J (1997) Physiological and morphological effects of genetic alterations leading to a reduced synthesis of UDP-glucose in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett.* **153**: 89-96.
- Dardalhon M, Lin W, Nicolas A & Averbek D (2007) Specific transcriptional responses induced by 8-methoxypsoralen and UVA in yeast. *FEMS Yeast Res.* **7**: 866-878.
- Davenport KR, Sohaskey M, Kamada Y, Levin DE & Gustin MC (1995) A second osmosensing signal transduction pathway in yeast. Hypotonic shock activates the PKC1 protein kinase-regulated cell integrity pathway. *J Biol Chem.* **270**: 30157-30161.

- Davenport KD, Williams KE, Ullmann BD & Gustin MC (1999) Activation of the *Saccharomyces cerevisiae* filamentation/invasion pathway by osmotic stress in high-osmolarity glycogen pathway mutants. *Genetics*. **153**: 1091-1103.
- Davis RJ (1993) The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem*. **268**: 14553-14556.
- Davydenko SG, Feng D, Jantti J & Keranen S (2005) Characterization of GPI14/YJR013w mutation that induces the cell wall integrity signalling pathway and results in increased protein production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. **22**: 993-1009.
- De Curtis F, Torriani S, Rossi E & De Cicco V (1996) Selection and use of *Metschnikowia pulcherrima* as a biological control agent for postharvest rots of peaches and table grapes. *Ann Microbiol Enzimol*. **46**: 45-55.
- De Groot PW, Ram AF & Klis FM (2005) Features and functions of covalently linked proteins in fungal cell walls. *Fungal Genet Biol*. **42**: 657-675.
- De Groot PW, Ruiz C, Vázquez de Aldana CR, Dueñas E, Cid VJ, Del Rey F, Rodríguez-Peña JM, Pérez P, Andel A, Caubín J, Arroyo J, García JC, Gil C, Molina M, García LJ, Nombela C & Klis FM (2001) A genomic approach for the identification and classification of genes involved in cell wall formation and its regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Comp Funct Genomics*. **2**: 124-142.
- de la Peña P, Barros F, Gascon S, Lazo PS & Ramas S (1981) Effect of yeast killer toxin on sensitive cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. **256**: 10420-10425.
- de la Peña P, Barros F, Gascon S, Ramos S & Lazo P (1980) Primary effects of yeast killer toxin. *Biochem Biophys Res Commun*. **96**: 544-550.
- de Nadal E, Alepuz PM & Posas F (2002) Dealing with osmostress through MAP kinase activation. *EMBO Rep*. **3**: 735-740.
- de Nadal E, Casadome L & Posas F (2003) Targeting the MEF2-like transcription factor Smp1 by the stress-activated Hog1 mitogen-activated protein kinase. *Mol Cell Biol*. **23**: 229-237.
- de Nadal E, Zapater M, Alepuz PM, Sumoy L, Mas G & Posas F (2004) The MAPK Hog1 recruits Rpd3 histone deacetylase to activate osmoresponsive genes. *Nature*. **427**: 370-374.
- Denis V & Cyert MS (2002) Internal Ca(2+) release in yeast is triggered by hypertonic shock and mediated by a TRP channel homologue. *J Cell Biol*. **156**: 29-34.
- de Nobel H & Lipke PN (1994) Is there a role for GPIs in yeast cell-wall assembly? *Trends Cell Biol*. **4**: 42-45.
- DeRisi JL, Iyer VR & Brown PO (1997) Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science*. **278**: 680-686.
- De Virgilio C, Hottiger T, Dominguez J, Boller T & Wiemken A (1994) The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast. I. Genetic evidence that trehalose is a thermoprotectant. *Eur J Biochem*. **219**: 179-186.

- Destruelle M, Holzer H & Klionsky DJ (1995) Isolation and characterization of a novel yeast gene, ATH1, that is required for vacuolar acid trehalase activity. *Yeast*. **11**: 1015-1025.
- Díaz S, Zinker S & Ruiz-Herrera J (1992) Alterations in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* induced by the a sex factor or a mutation in the cell cycle. *Anton Leeuw Int J G*. **61**: 269-276.
- Diep DB, Nelson KL, Raja SM, Pleshak EN & Buckley JT (1998) Glycosylphosphatidylinositol anchors of membrane glycoproteins are binding determinants for the channel-forming toxin aerolysin. *J Biol Chem*. **273**: 2355-2360.
- Dignard D, Whiteway M, Germain D, Tessier D & Thomas DY (1991) Expression in yeast of a cDNA copy of the K2 killer toxin gene. *Mol Gen Genet*. **227**: 127-136.
- Dihazi H, Kessler R & Eschrich K (2004) High osmolarity glycerol (HOG) pathway-induced phosphorylation and activation of 6-phosphofructo-2-kinase are essential for glycerol accumulation and yeast cell proliferation under hyperosmotic stress. *J Biol Chem*. **279**: 23961-23968.
- Dmochowska A, Dignard D, Henning D, Thomas DY & Bussey H (1987) Yeast KEX1 gene encodes a putative protease with a carboxypeptidase B-like function involved in killer toxin and alpha-factor precursor processing. *Cell*. **50**: 573-584.
- Douglas CM, Sturley SL & Bostian KA (1988) Role of protein processing, intracellular trafficking and endocytosis in production of and immunity to yeast killer toxin. *Eur J Epidemiol*. **4**: 400-408.
- Dranginis AM, Rauceo JM, Coronado JE & Lipke PN (2007) A biochemical guide to yeast adhesins: glycoproteins for social and antisocial occasions. *Microbiol Mol Biol Rev*. **71**: 282-294.
- Droby S, Hofstein R, Wilson C, Wisniewski M, Fridlender B, Cohen L, Weiss B, Daus A & Chalutz E (1996) Pilot test of *Pichia guilliermondii*: a biocontrol agent of postharvest diseases of citrus fruit. *Biol Control*. **3**: 47-52.
- Eastmond DL & Nelson HC (2006) Genome-wide analysis reveals new roles for the activation domains of the *Saccharomyces cerevisiae* heat shock transcription factor (Hsf1) during the transient heat shock response. *J Biol Chem*. **281**: 32909-32921.
- Ecker M, Deutzmann R, Lehle L, Mersa V & Tanner W (2006) Pir proteins of *Saccharomyces cerevisiae* are attached to  $\beta$ -1,3-glucan by a new protein-carbohydrate linkage. *J Biol Chem*. **281**: 11523-11529.
- Edgerton M, Koshlukova SE, Lo TE, Chrzan BG, Straubinger RM & Raj PA (1998) Candidacidal activity of salivary Histatins: identification of a Histatin 5-binding protein on *Candida albicans*. *J Biol Chem*. **273**: 20438-20447.
- Edman P (1949) A method for the determination of amino acid sequence in peptides. *Arch Biochem*. **3**: 475.
- Edman P & Begg G (1967) A protein sequenator. *Eur J Biochem*. **1**: 80-91.

- Eisfeld K, Riffer F, Mentges J & Schmitt MJ (2000) Endocytotic uptake and retrograde transport of a virally encoded killer toxin in yeast. *Mol Microbiol.* **37**: 926-940.
- Elbein AD (1974) The metabolism of  $\alpha,\alpha$ -trehalose. *Adv Carbohydr Chem Biochem.* **30**: 227-256.
- Ellis RJ & van der Vies SM (1991) Molecular chaperones. *Annu Rev Biochem.* **60**: 321-347.
- Englund PT (1993) The structure and biosynthesis of glycosyl phosphatidylinositol protein anchors. *Annu Rev Biochem.* **62**: 121-138.
- Entian KD, Schuster T, Hegemann JH, Becher D, Feldmann H, Güldener U, Götz R, Hansen M, Hollenberg CP, Jansen G, *et al.* (1999) Functional analysis of 150 deletion mutants in *Saccharomyces cerevisiae* by a systematic approach. *Mol Gen Genet.* **262**: 683-702.
- Epstein CB, Waddle JA, Hale W 4th, Dave V, Thornton J, Macatee TL, Garner HR & Butow RA (2001) Genome-wide responses to mitochondrial dysfunction. *Mol Biol Cell.* **12**: 297-308.
- Erez O & Kahana C (2002) Deletions of SKY1 or PTK2 in the *Saccharomyces cerevisiae* *trk1 $\Delta$  trk2 $\Delta$*  mutant cells exert dual effect on ion homeostasis. *Biochem Biophys Res Commun.* **295**: 1142-1149.
- Eriksson P, Alipour H, Adler L & Blomberg A (2000) Rap1p-binding sites in the *saccharomyces cerevisiae* GPD1 promoter are involved in its response to NaCl. *J Biol Chem.* **275**: 29368-29376.
- Errede B, Cade RM, Yashar BM, Kamada Y, Levin DE, Irie K & Matsumoto K (1995) Dynamics and organization of MAP kinase signal pathways. *Mol Reprod Dev.* **42**: 477-485.
- Erten H & Campbell L (2001) The production of low-alcohol wines by aerobic yeasts. *Journal of the Institute of Brewing.* **107**: 207-215.
- Estrada E, Agostinis P, Vandenheede JR, Goris J, Merlevede W, François J, Goffeau A & Ghislain M (1996) Phosphorylation of yeast plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase by casein kinase I. *J Biol Chem.* **271**: 32064-32072.
- Fairman C, Zhou X & Kung C (1999) Potassium uptake through the TOK1 K<sup>+</sup> channel in the budding yeast. *J Membr Biol.* **168**: 149-157.
- Fankhauser C, Homans SW, Thomas-Oates JE, McConville MJ, Desponds C, Conzelmann A & Ferguson MA (1993) Structures of glycosylphosphatidylinositol membrane anchors from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* **268**: 26365-26374.
- Ferguson SB, Anderson ES, Harshaw RB, Thate T, Craig NL & Nelson HC (2005) Protein kinase A regulates constitutive expression of small heat-shock genes in an Msn2/4p-independent and Hsf1p-dependent manner in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* **169**: 1203-1214.
- Ferguson MA, Homans SW, Dwek RA & Rademacher TW (1998) Glycosylphosphatidylinositol moiety that anchors *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein to the membrane. *Science.* **239**: 753-759.

- Fernández R, Herrero P, Fernández MT & Moreno F (1986) Mechanism of inactivation of hexokinase PII of *Saccharomyces cerevisiae* by D-xylose. *J Gen Microbiol.* **132**: 3467-3472.
- Ferreira C, van Voorst F, Martins A, Neves L, Oliveira R, Kielland-Brandt MC, Lucas C & Brandt A (2005) A member of the sugar transporter family, Stl1p is the glycerol/H<sup>+</sup> symporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell.* **16**: 2068-2076.
- Ferrigno P, Posas F, Koepp D, Saito H & Silver PA (1998) Regulated nucleo/cytoplasmic exchange of HOG1 MAPK requires the importin beta homologs NMD5 and XPO1. *EMBO J.* **17**: 5606-5614.
- Filonow AB (1998) Role of competition for sugars by yeasts in biocontrol of gray mold of apple. *Biocontrol Sci Technol.* **8**: 243-256.
- Fleet GH (1991) Cell wall In: Rose AH & Harrison JS (eds.) *The Yeast* (2<sup>nd</sup> edition). Academic Press, London, pp. 199-277.
- Fraering P, Imhof I, Meyer U, Strub JM, van Dorsselaer A, Vionnet C & Conzelmann A (2001) The GPI transamidase complex of *Saccharomyces cerevisiae* contains Gaa1p, Gpi8p, and Gpi16p. *Mol Biol Cell.* **10**: 3295-3306.
- Francois J & Parrou JL (2001) Reserve carbohydrates metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev.* **25**: 125-145.
- Gaber RF (1992) Molecular genetics of yeast ion transport. *Int Rev Cytol.* **137**: 299-353.
- Gaber RF, Styles CA & Fink GR (1988) TRK1 encodes a plasma membrane protein required for high-affinity potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* **8**: 2848-2859.
- Gadd GM, Chalmers K & Reed RH (1987) The role of trehalose in dehydration resistance of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett.* **48**: 249-254.
- Gancedo JM (1998) Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol Mol Biol Rev.* **62**: 334-361.
- Gancedo JM, Clifton D & Fraenkel DG (1977) Yeast hexokinase mutants. *J Biol Chem.* **252**: 4443-4444.
- Garay-Arroyo A, Colmenero-Flores JM, Garciarrubio A & Covarrubias AA (2000) Highly hydrophilic proteins in prokaryotes and eukaryotes are common during conditions of water deficit. *J Biol Chem.* **275**: 5668-5674.
- García R, Bermejo C, Grau C, Pérez R, Rodríguez-Peña JM, Francois J, Nombela C & Arroyo J (2004) The global transcriptional response to transient cell wall damage in *Saccharomyces cerevisiae* and its regulation by the cell integrity signaling pathway. *J Biol Chem.* **279**: 15183-15195.
- García-Arranz M, Maldonado AM, Mazón MJ & Portillo F (1994) Transcriptional control of yeast plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase by glucose. Cloning and characterization of a new gene involved in this regulation. *J Biol Chem.* **269**: 18076-18082.



- Garciadeblas B, Rubio F, Quintero FJ, Banuelos MA, Haro R & Rodriguez-Navarro A (1993) Differential expression of two genes encoding isoforms of the ATPase involved in sodium efflux in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet.* **236**: 363-368.
- Gasch AP, Spellman PT, Kao CM, Carmel-Harel O, Eisen MB, Storz G, Botstein D & Brown PO (2000) Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol Cell.* **11**: 4241-4257.
- Gásková D, Kurweilova H, Denksteinova B, Herman P, Vecer J, Sigler K, Plasek J & Malinsky J (1994) Study of membrane potential changes of yeast cells caused by killer toxin K1. *Folia Microbiol.* **39**: 516-517.
- Gerber LD, Kodukula K & Udenfriend S (1992) Phosphatidylinositol glycan (PI-G) anchored membrane proteins. Amino acid requirements adjacent to the site of cleavage and PI-G attachment in the COOH-terminal signal peptide. *J Biol Chem.* **267**: 12168-12173.
- Gething MJ & Sambrook J (1992) Protein folding in the cell. *Nature (London).* **355**: 33-45.
- Ghaemmaghami S, Huh WK, Bower K, Howson RW, Belle A, Dephoure N, O'Shea EK & Weissman JS (2003) Global analysis of protein expression in yeast. *Nature.* **425**: 737-741.
- Gietz RD & Woods RA (2002) Transformation of yeast by the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Methods in Enzymology.* **350**: 87-96.
- Gill DE (1974) Intrinsic rate of increase, saturation density and competitive ability. II. The evolution of competitive ability. *Am Nat.* **108**: 103-116.
- Gille H, Sharrocks AD & Shaw PE (1992) Phosphorylation of transcription factor p62TCF by MAP kinase stimulates ternary complex formation at c-fos promoter. *Nature.* **358**: 414-417.
- Gitan RS, Luo H, Rodgers J, Broderius M & Eide D (1998) Zinc-induced inactivation of the yeast ZRT1 zinc transporter occurs through endocytosis and vacuolar degradation. *J Biol Chem.* **273**: 28617-28624.
- Godon C, Lagniel G, Lee J, Buhler JM, Kieffer S, Perrot M, Boucherie H, Toledano MB & Labarre J (1998) The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimulon in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* **273**: 22480-22489.
- Goffeau A & Slayman CW (1981) The proton-translocating ATPase of the fungal plasma membrane. *Biochim Biophys Acta.* **639**: 197-223.
- Golubev WI (1998) Killer activity of *Tilletiopsis albescens* Gohkale: Taxonomic and phylogenetic implication. *Syst Appl Microbiol.* **21**: 429-432.
- Golubev WI & Boekhout T (1995) Sensitivity to killer toxins as a taxonomic tool among heterobasidiomycetous yeasts. *Studies Mycol.* **38**: 47-58.
- Gómez MJ, Luyten K, Onuhua CN & Ramos J (1994) Sodium tolerance depends on the capacity to transport potassium in *Saccharomyces cerevisiae*. *Folia Microbiol (Praha).* **39**: 519-520.

- Gómez MJ, Luyten K & Ramos J (1996) The capacity to transport potassium influences sodium tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett.* **135**: 157-160.
- Gordon VM, Nelson KL, Buckley JT, Stevens VL, Tweten RK, Elwood PC & Leppla SH (1999) *Clostridium septicum* alpha toxin uses glycosylphosphatidylinositol-anchored protein receptors. *J Biol Chem.* **274**: 27274-27280.
- Görner W, Durchschlag E, Martinez-Pastor MT, Estruch F, Ammerer G, Hamilton B, Ruis H & Schüller C (1998) Nuclear localization of the C2H2 zinc finger protein Msn2p is regulated by stress and protein kinase A activity. *Genes Dev.* **12**: 586-597.
- Grant CM, Perrone G & Dawes IW (1998) Glutathione and catalase provide overlapping defenses for protection against hydrogen peroxide in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun.* **253**: 893-898.
- Gratia A (1925) Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de colibacille. *Compt Rend Soc Biol.* **93**: 1040-1042.
- Grill LK & Garger SJ (1981) Identification and characterization of double-stranded RNA associated with cytoplasmic male sterility in *Vicia faba*. *Proc Natl Acad Sci USA.* **78**: 7043-7046.
- Gross DS, English KE, Collins KW & Lee S (1990) Genomic footprinting of the yeast HSP82 promoter reveals marked distortion of the DNA helix and constitutive occupancy of heat shock and TATA elements. *J Mol Biol.* **216**: 611-631.
- Gulshan K, Rovinsky SA, Coleman ST & Moye-Rowley WS (2005) Oxidant-specific folding of Yap1p regulates both transcriptional activation and nuclear localization. *J Biol Chem.* **280**: 40524-40533.
- Gunge N, Tamaru A, Ozawa F & Sakaguchi K (1981) Isolation and characterization of linear deoxyribonucleic acid plasmids from *Kluyveromyces lactis* and the plasmid-associated killer character. *J Bacteriol.* **145**: 382-390.
- Gustin MC, Albertyn J, Alexander M & Davenport K (1998) MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol Biol Rev.* **62**: 1264-1300.
- Gustin MC, Martinac B, Saimi Y, Culbertson MR & Kung C (1986) Ion channels in yeast. *Science.* **233**: 1195-1197.
- Guyard C, Séguy N, Cailliez JC, Drobecq H, Polonelli L, Dei-Cas E, Mercenier A & Menozzi FD (2002) Characterization of a *Williopsis saturnus* var. *mrakii* high molecular weight secreted killer toxin with broad-spectrum antimicrobial activity. *J Antimicrob Chemother.* **49**: 961-971.
- Hahn JS, Hu Z, Thiele DJ & Iyer VR (2004) Genome-wide analysis of the biology of stress responses through heat shock transcription factor. *Mol Cell Biol.* **24**: 5249-5256.
- Haitani Y, Shimoi H & Takagi H (2006) Rsp5 regulates expression of stress proteins via post-translational modification of Hsf1 and Msn4 in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **580**: 3433-3438.

- Hall JP, Cherkasova V, Elion E, Gustin MC & Winter E (1996) The osmoregulatory pathway represses mating pathway activity in *Saccharomyces cerevisiae*: isolation of a *FUS3* mutant that is insensitive to the repression mechanism. *Mol Cell Biol.* **16**: 6715-6723.
- Hamad SH (2008) Microbial spoilage of date rutab collected from the markets of Al-Hofuf city in the Kingdom of Saudi Arabia. *J Food Prot.* **71**: 1406-1411.
- Hanes SD, Burn VE, Sturley SL, Tipper DJ & Bostian KA (1986) Expression of a cDNA derived from the yeast killer preprotoxin gene: implications for processing and immunity. *Proc Natl Acad Sci USA.* **83**: 1675-1679.
- Hansen EC (1888) Recherches sur la physiologie et la morphologie des ferments alcooliques. VII. Action des ferments alcooliques sur les diverses especes de sucre. *C R Trav Lab.* **2**: 143-167.
- Hansen EC (1904) Grundlinien zur Systematik der Saccharomyceten. *Zentralbl Bakteriol Parasitenkd.* **12**: 529-538.
- Haro R, Bañuelos MA, Quintero FJ, Rubio F & Rodríguez-Navarro A (1993) Genetic basis of sodium exclusion and sodium tolerance in yeast. A model for plants. *Physiol Plant.* **89**: 868-874.
- Haro R, Garciadeblas B & Rodríguez-Navarro A (1991) A novel P-type ATPase from yeast involved in sodium transport. *FEBS Lett.* **291**: 189-191.
- Haro R & Rodríguez-Navarro A (2002) Molecular analysis of the mechanism of potassium uptake through the TRK1 transporter of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta.* **1564**: 114-122.
- Haro R & Rodríguez-Navarro A (2003) Functional analysis of the M2d helix of the TRK1 potassium transporter of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta.* **1613**: 1-6.
- Haro R, Sainz L, Rubio F & Rodríguez-Navarro A (1999) Cloning of two genes encoding potassium transporters in *Neurospora crassa* and expression of the corresponding cDNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol.* **31**: 511-520.
- Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu JK & Bohnert HJ (2000) Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* **51**: 463-499.
- Haslbeck M, Miess A, Stromer T, Walter S & Buchner J (2005) Disassembling protein aggregates in the yeast cytosol. The cooperation of Hsp26 with Ssa1 and Hsp104. *J Biol Chem.* **280**: 23861-23868.
- Hayman GT & Bolen PL (1991) Linear DNA plasmids of *Pichia inositovora* are associated with a novel killer toxin activity. *Curr Genet.* **19**: 389-393.
- Heard GM & Fleet GH (1987) Occurrence and growth of killer yeasts during wine fermentations. *Appl Environ Microbiol.* **51**: 539-545.
- Heath VL, Shaw SL, Roy S & Cyert MS (2004) Hph1p and Hph2p, novel components of calcineurin-mediated stress responses in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell.* **3**: 695-704.

- Helmerhorst EJ, Breeuwer P, Van't Hof WE, Walgreen-Weterings E, Oomen LC, Veerman EC, Amerongen AV & Abee T (1999) The cellular target of histatin 5 on *Candida albicans* is the energized mitochondrion. *J Biol Chem.* **274**: 7286-7291.
- Hernández A, Martín A, Aranda E, Pérez-Nevado F & Córdoba MG (2006) Identification and characterization of yeast isolated from the elaboration of seasoned green table olives. *Food Microbiol.* **24**: 346–351.
- Herrero P, Galíndez J, Ruiz N, Martínez-Campa C & Moreno F (1995) Transcriptional regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* *HXK1*, *HXK2* and *GLK1* genes. *Yeast.* **11**: 137-144.
- Hersen P, McClean MN, Mahadevan L & Ramanathan S (2008) Signal processing by the HOG MAP kinase pathway. *Proc Natl Acad Sci USA.* **105**: 7165-7170.
- Herskowitz I (1995) MAP kinase pathways in yeast: for mating and more. *Cell.* **80**: 187-197.
- Higuchi R, Krummel B & Saiki R (1998) A general method of *in vitro* preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Res.* **16**: 7351-7367.
- Hirt H (1997) Multiple roles of MAP kinases in plant signal transduction. *Trends Plant Sci.* **2**: 11-15.
- Hodgson VJ, Button D & Walker GM (1995) Anti-Candida activity of a novel killer toxin from the yeast *Williopsis mrakii*. *Microbiology.* **141**: 2003-2012.
- Hohmann S (1997) Shaping up: the responses of yeast to osmotic stress. In: Hohmann S & Mager WH (eds.) *Yeast Stress Responses*. Lexington: R. G. Landes. pp. 101-146.
- Hohmann S (2002) Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev.* **66**: 300-372.
- Homans SW, Ferguson MA, Dwek RA, Rademacher TW, Anand R & Williams AF (1988) Complete structure of the glycosyl phosphatidylinositol membrane anchor of rat brain Thy-1 glycoprotein. *Nature.* **333**: 269-272.
- Hottiger T, Boller T & Wiemken A (1987) Rapid changes of heat and desiccation tolerance correlated with changes of trehalose content in *Saccharomyces cerevisiae* cells subjected to temperature shifts. *FEBS Lett.* **220**: 113-115.
- Hounsa CG, Brandt EV, Thevelein J, Hohmann S & Prior BA (1998) Role of trehalose in survival of *Saccharomyces cerevisiae* under osmotic stress. *Microbiology.* **144**: 671-680.
- Hunter T & Plowman GD (1997) The protein kinases of budding yeast: six score and more. *Trends Biochem Sci.* **22**: 18-22.
- Hutchins K & Bussey H (1983) Cell wall receptor for yeast killer toxin: involvement of 1,6- $\beta$ -D-glucan. *J Bacteriol.* **154**: 161-169.
- Icho T & Wickner RB (1989) The double-stranded RNA genome of yeast virus L-A encodes its own putative RNA polymerase by fusing two open reading frames. *J Biol Chem.* **264**: 6716-6723.

- Igual JC & Estruch F (2000) Signalling stress in yeast. *Food Technol Biotechnol.* **38**: 263-276.
- Ikezawa H (2002) Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins. *Biol Pharm Bull.* **25**: 409-417.
- Imhof I, Flury I, Vionnet C, Roubaty C, Egger D & Conzelmann A (2004) Glycosylphosphatidylinositol (GPI) proteins of *Saccharomyces cerevisiae* contain ethanolamine phosphate groups on the alpha1,4-linked mannose of the GPI anchor. *J Biol Chem.* **279**: 19614-19627.
- Izawa S, Maeda K, Sugiyama K, Mano J, Inoue Y & Kimura A (1999) Thioredoxin deficiency causes the constitutive activation of Yap1, an AP-1-like transcription factor in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* **274**: 28459-28465.
- Izgü F, Altinbay D & Sertkaya A (2005) Enzymic activity of the K5-type yeast killer toxin and its characterization. *Biosci Biotechnol Biochem.* **69**: 2200-2206.
- Izgü F, Altinbay D & Türeli AE (2007) In vitro susceptibilities of *Candida* spp. to Panomycin, a novel exo-beta-1,3-glucanase isolated from *Pichia anomala* NCYC 434. *Microbiol Immunol.* **51**: 797-803.
- Jablonowski D, Butler AR, Fichtner L, Gardiner D, Schaffrath R & Stark MJ (2001) Sit4p protein phosphatase is required for sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to *Kluyveromyces lactis* zymocin. *Genetics.* **159**: 1479-1489.
- Jakobsen BK & Pelham HR (1988) Constitutive binding of yeast heat shock factor to DNA in vivo. *Mol Cell Biol.* **8**: 5040-5042.
- Jamieson DJ, Rivers S & Stephen DWS (1994) Analysis of *Saccharomyces cerevisiae* proteins induced by peroxide and superoxide stress. *Microbiology.* **140**: 3277-3283.
- Janderová B, Gásková D, Bendová O (1995) Consequences of *Sporidiobolus pararoseus* killer toxin action on sensitive cells. *Folia Microbiol.* **40**: 165-167.
- Janisiewicz WJ (1994) Enhancement of biocontrol of blue mold with the nutrient analog 2-deoxy-D-glucose on apples and pears. *Appl Environ Microbiol.* **60**: 2671-2676.
- Javadekar VS, SivaRaman H, Gokhale DV (1995) Industrial yeast strain improvement: construction of a highly flocculent yeast with a killer character by protoplast fusion. *J Indust Microbiol.* **15**: 94-102.
- Jelinski SA & Samson ID (1999) Global response of *Saccharomyces cerevisiae* to an alkylating agent. *Proc Natl Acad Sci USA.* **87**: 6228-6232.
- Jentoft N (1990) Why are proteins O-glycosylated? *Trends Biol Sci.* **15**: 291-294.
- Jiang B, Sheraton J, Ram AF, Dijkgraaf G, Klis FM & Bussey H (1995) CWH41 encodes a novel endoplasmic reticulum membrane N-glycoprotein involved in  $\beta$ 1,6-glucan assembly. *J Bacteriol.* **178**: 1162-1171.
- Johansson I & Blatt MR (2006) Interactive domains between pore loops of the yeast K<sup>+</sup> channel TOK1 associate with extracellular K<sup>+</sup> sensitivity. *Biochem J.* **393**: 645-655.

- Joklik WK (1974) Reproduction of Reoviridae. In: Frankel-Conrat H & Wagner RR (eds.) *Comprehensive Virology*, Vol. 2, Plenum, New York, pp. 231-334.
- Jules M, Beltran G, Francois J & Parrou JL (2008) New insights into trehalose metabolism by *Saccharomyces cerevisiae*: NTH2 encodes a functional cytosolic trehalase, and deletion of TPS1 reveals Ath1p-dependent trehalose mobilization. *Appl Environ Microbiol.* **74**: 605-614.
- Jules M, Francois J & Parrou JL (2005) Autonomous oscillations in *Saccharomyces cerevisiae* during batch cultures on trehalose. *FEBS J.* **272**: 1490-1500.
- Julius D, Brake A, Blair L, Kunisawa R & Thorner J (1984) Isolation of the putative structural gene for the lysine-arginine cleaving endopeptidase required for processing of yeast prepro- $\alpha$ -factor. *Cell.* **37**: 1075-1089.
- Kagan BL (1983) Mode of action of killer yeast toxins: channel formation in lipid bilayers. *Nature.* **302**: 709-711.
- Kaida D, Yashiroda H, Toh-e A & Kikuchi Y (2002) Yeast Whi2 and Psr1-phosphatase form a complex and regulate STRE-mediated gene expression. *Genes Cells.* **7**: 543-552.
- Kapteyn JC, Montijn RC, Vink E, De la Cruz J, Llobell A, Douwes JE, Shimoi H, Lipke PN & Klis FM (1996) Retention of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall proteins through a phosphodiester-linked  $\beta$ -1,3- $\beta$ -1,6-glucan heteropolymer. *Glycobiology.* **6**: 337-345.
- Kapteyn JC, ter Riet B, Vink E, Blad S, De Nobel H, Van Den Ende H & Klis FM (2001) Low external pH induces HOG1 dependent changes in the organization of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Mol Microbiol.* **39**: 469-479.
- Kapteyn JC, Van Den Ende H & Klis FM (1999a) The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall. *Biochim Biophys Acta.* **1426**: 373-383.
- Kapteyn JC, Van Egmond P, Sievi E, Makarow M, Van Den Ende H & Klis FM (1999b) The contribution of the O-glycosylated protein Pir2p/Hsp150 to the construction of the yeast cell wall in wild-type cells and b-1,6-glucan-deficient mutants. *Mol Microbiol.* **31**: 1835-1844.
- Ketchum KA, Joiner WJ, Sellers AJ, Kaczmarek LK & Goldstein SA (1995) A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem. *Nature.* **376**: 690-695.
- Kim JH, Polish J & Johnston M (2003) Specificity and regulation of DNA binding by the yeast glucose transporter gene repressor Rgt1. *Mol Cell Biol.* **23**: 5208-5216.
- Kim S, Schilke B, Craig EA & Horwich AL (1998) Folding in vivo of a newly translated yeast cytosolic enzyme is mediated by the SSA class of cytosolic yeast Hsp70 proteins. *Proc Natl Acad Sci USA.* **95**: 12860-12865.
- Kinclova-Zimmermannova O, Gaskova D & Sychrova H (2006) The Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> - antiporter Nha1 influences the plasma membrane potential of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* **6**: 792-800.

- Kinclova-Zimmermannova O & Sychrova H (2006) Functional study of the Nha1p C-terminus: involvement in cell response to changes in external osmolarity. *Curr Genet.* **49**: 229-236.
- Kitamoto HK, Hasebe A, Ohmomo S, Suto EG, Muraki M & Iimura Y (1999) Prevention of aerobic spoilage of maize silage by a genetically modified killer yeast, *Kluyveromyces lactis*, defective in the ability to grow on lactic acid. *Appl Environ Microbiol.* **65**: 4697-4700.
- Kitamoto HK, Ohmomo S & Nakahara T (1993) Selection of killer yeasts (*Kluyveromyces lactis*) to prevent aerobic deterioration in silage making. *J Dairy Sci.* **76**: 803-811.
- Klassen R, Jablonowski D, Stark MJ, Schaffrath R & Meinhardt F (2006) Mating-type locus control of killer toxins from *Kluyveromyces lactis* and *Pichia acaciae*. *FEMS Yeast Res.* **6**: 404-413.
- Klassen R, Krampe S & Meinhardt F (2007) Homologous recombination and the yKu70/80 complex exert opposite roles in resistance against the killer toxin from *Pichia acaciae*. *DNA Repair (Amst).* **6**: 1864-1875.
- Klassen R & Meinhardt F (2003) Structural and functional analysis of the killer element pPin1-3 from *Pichia inositolovora*. *Mol Genet Genomics.* **270**: 190-199.
- Klassen R, Paluszynski JP, Wemhoff S, Pfeiffer A, Fricke J & Meinhardt F (2008) The primary target of the killer toxin from *Pichia acaciae* is tRNA (Gln). *Mol Microbiol.* **69**: 681-697.
- Klassen R, Teichert S & Meinhardt F (2004) Novel yeast killer toxins provoke S-phase arrest and DNA damage checkpoint activation. *Mol Microbiol.* **53**: 263-273.
- Klis FM, Boorsma A & De Groot PW (2006) Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* **23**: 185-202.
- Klis FM, Caro LH, Vossen JH, Kapteyn JC, Ram AF, Montijn RC, Van Berkel MA & Van den Ende H (1997) Identification and characterization of a major building block in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Soc Trans.* **25**: 856-860.
- Klis FM, Mol P, Hellingwerf K & Brul S (2002) Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev.* **26**: 239-256.
- Ko CH, Buckley AM & Gaber RF (1990) TRK2 is required for low affinity K<sup>+</sup> transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* **125**: 305-312.
- Ko CH & Gaber RF (1991) TRK1 and TRK2 encode structurally related K<sup>+</sup> transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* **11**: 4266-4273.
- Kobayashi N, McClanahan TK, Simon JR, Treger JM, McEntee K (1996) Structure and functional analysis of the multistress response gene DDR2 from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun.* **229**: 540-547.
- Kobayashi N & McEntee K (1990) Evidence for a heat shock transcription factor-independent mechanism for heat shock induction of transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA.* **87**: 6550-6554.

- Kobayashi N & McEntee K (1993) Identification of cis and trans components of a novel heat shock stress regulatory pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* **13**: 248-256.
- Kollár R, Reinhold BB, Petráková E, Yeh HJ, Ashwell G, Drgonová J, Kapteyn JC, Klis FM & Cabib E (1997) Architecture of the yeast cell wall.  $\beta(1\rightarrow6)$ -glucan interconnects mannoprotein,  $\beta(1\rightarrow3)$ -glucan, and chitin. *J Biol Chem.* **272**: 17762-17775.
- Kopp M, Muller H & Holzer H (1993) Molecular analysis of the neutral trehalase gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* **268**: 4766-4774.
- Koshlukova SE, Araujo MWB, Baev D & Edgerton M (2000) Released ATP is an extracellular cytotoxic mediator in salivary histatin 5-induced killing of *Candida albicans*. *Infect Immun.* **68**: 6848-6856.
- Kotani H, Shinmyo A & Enatsu T (1977) Killer toxin for sake yeast: properties and effects of adenosine 5'-diphosphate and calcium ion on killing action. *J. Bacteriol.* **129**: 640-650.
- Kotzekidou, P (1997) Identification of yeasts from black olives in rapid system microtitre plates. *Food Microbiol.* **14**: 609-616.
- Kruckeberg AL (1996) The hexose transporter family of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol.* **166**: 283-292.
- Kruckeberg AL, Walsh MC & Van Dam K (1998) How do yeast cells sense glucose? *Bioessays.* **20**: 972-976.
- Kuge S, Jones N & Nomoto A (1997) Regulation of yAP-1 nuclear localization in response to oxidative stress. *EMBO J.* **16**: 1710-1720.
- Kukuruzinska MA, Bergh MLE & Jackson BJ (1987) Protein glycosylation in yeast. *Annu Rev Biochem.* **56**: 915-944.
- Kuo MH & Grayhack E (1994) A library of yeast genomic MCM1 binding sites contains genes involved in cell cycle control, cell wall and membrane structure, and metabolism. *Mol Cell Biol.* **14**: 348-359.
- Kuroda T, Bihler H, Bashir E, Slayman CL & Rivetta A (2004) Chloride channel function in the yeast TRK-potassium transporters. *J Membr Biol.* **198**: 177-192.
- Kurtzman CP (1984) *Pichia membranaefaciens* Hansen. In: Kregervan Rij NJ (ed.) *The Yeasts a Taxonomic Study* (3<sup>rd</sup> edition). Elsevier, Amsterdam, pp. 338-340.
- Kurtzman CP (1994) Synonymy of the yeast genera *Hansenula* and *Pichia* demonstrated through comparisons of deoxyribonucleic acid relatedness. *Anton Leeuw Int J G.* **50**: 209-217.
- Kurzweilová H & Sigler K (1995) Significance of the lag phase in K1 killer toxin action on sensitive yeast cells. *Folia Microbiologica.* **40**: 213-215.
- Lachance MA & Pang WM (1997) Predacious yeasts. *Yeast.* **13**: 225-232.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**: 680-685.



- Larsen JC, Szymanski C & Guerry P (2004) N-linked protein glycosylation is required for full competence in *Campylobacter jejuni* 81-176. *J Bacteriol.* **186**: 6508-6514.
- Lawrence CL, Botting CH, Antrobus R & Coote PJ (2004) Evidence of a new role for the high-osmolarity glycerol mitogen-activated protein kinase pathway in yeast: regulating adaptation to citric acid stress. *Mol Cell Biol.* **24**: 3307-3323.
- Leidich SD, Kostova Z, Latek RR, Costello LC, Drapp DA, Gray W, Fassler JS & Orlean P (1995) Temperature-sensitive yeast GPI anchoring mutants *gpi2* and *gpi3* are defective in the synthesis of N-acetylglucosaminyl phosphatidylinositol. *J Biol Chem.* **270**: 13029-13035.
- Leidich SD & Orlean P (1996) Gpi1, a *Saccharomyces cerevisiae* protein that participates in the first step in glycosylphosphatidylinositol anchor synthesis. *J Biol Chem.* **271**: 27829-27837.
- Lesage F, Guillemare E, Fink M, Duprat F, Lazdunski M, Romey G & Barhanin J (1996) A pH-sensitive yeast outward rectifier K<sup>+</sup> channel with two pore domains and novel gating properties. *J Biol Chem.* **271**: 4183-4187.
- Levin DE (2005) Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev.* **69**: 262-291.
- Levin DE & Errede B (1995) The proliferation of MAP kinase signaling pathways in yeast. *Curr Opin Cell Biol.* **7**: 197-202.
- Lewis JG, Learmonth RP & Watson K (1995) Induction of heat, freezing and salt tolerance by heat and salt shock in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology.* **141**: 687-694.
- Li N, Erman M, Pangborn W, Duax WL, Park CM, Bruen J & Ghosh D (1999) Structure of *Ustilago maydis* killer toxin KP6 alpha-subunit. A multimeric assembly with a central pore. *J Biol Chem.* **274**: 20425-20431.
- Lillie SH & Pringle JR (1980) Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: responses to nutrient limitation. *J Bacteriol.* **143**: 1384-1394.
- Lindquist S & Craig EA (1988) The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet.* **22**: 631-677.
- Lindquist S & Kim G (1996) Heat-shock protein 104 expression is sufficient for thermotolerance in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA.* **93**: 5301-5306.
- Lipke PN & Ovalle R (1998) Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. *J. Bacteriol.* **180**: 3735-3740.
- Livak KJ & Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using Real Time Quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔCt</sup> method. *Methods.* **25**: 402-408.
- Llorente P, Marquina D, Santos A, Peinado JM & Spencer-Martins I (1997) Effect of salt on the killer phenotype of yeasts from olive brines. *Appl Environ Microbiol.* **63**: 1165-1167.
- Lobo Z & Maitra PK (1977) Physiological role of glucose-phosphorylating enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Biochem Biophys.* **182**: 639-645.

- Lodder J & Kreger-van Rij NJ (1952) *Pichia membranaefaciens* Hansen. In: Kreger-van Rij NJ (ed.) *The Yeasts a Taxonomic Study* (1<sup>st</sup> edition). North-Holland, Amsterdam, pp 232-238.
- Lolle S & Bussey H (1986) *In vivo* evidence for posttranslational translocation and signal cleavage of the killer preprotoxin of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* **6**: 4274-4280.
- Lolle S, Skipper N, Bussey H & Thomas DY (1984) The expression of cDNA clones of yeast M1 double-stranded RNA in yeast confers both killer and immunity phenotypes. *EMBO J.* **3**: 1983-1987.
- Loukin SH & Saimi Y (2002) Carboxyl tail prevents yeast K(+) channel closure: proposal of an integrated model of TOK1 gating. *Biophys J.* **82**: 781-792.
- Lowes KF, Shearman CA, Payne J, MacKenzie D, Archer DB, Merry RJ & Gasson MJ (2000) Prevention of yeast spoilage in feed and food by the yeast mycocin HMK. *Appl Environ Microbiol.* **66**: 1066-1076.
- Lucau-Danila A, Lelandais G, Kozovska Z, Tanty V, Delaveau T, Devaux F & Jacq C (2005) Early expression of yeast genes affected by chemical stress. *Mol Cell Biol.* **25**: 1860-1868.
- Lyne R, Burns G, Mata J, Penkett CJ, Rustici G, Chen D, Langford C, Vetrie D & Bähler J (2003) Whole-genome microarrays of fission yeast: characteristics, accuracy, reproducibility, and processing of array data. *BMC Genomics.* **4**: 27-41.
- MacKenzie CR, Hiram T & Buckley JT (1999) Analysis of receptor binding by the channel-forming toxin aerolysin using surface plasmon resonance. *J Biol Chem.* **274**: 22604-22609.
- MacKenzie KF, Singh KK & Grown AD (1988) Water stress plating hypersensitivity of yeasts: protective role of trehalose in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Microbiol.* **134**: 1661-1666.
- Macpherson N, Shabala L, Rooney H, Jarman MG & Davies JM (1995) Plasma membrane H<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> transporters are involved in the weak-acid preservative response of disparate food spoilage yeasts. *Microbiology.* **151**: 1995-2003.
- Madrid R, Gómez MJ, Ramos J & Rodríguez-Navarro A (1998) Ectopic potassium uptake in *trk1 trk2* mutants of *Saccharomyces cerevisiae* correlates with a highly hyperpolarized membrane potential. *J Biol Chem.* **273**: 14838-14844.
- Maeda T, Takekawa M & Saito H (1995) Activation of yeast PBS2 MAPKK by MAPKKs or by binding of an SH3-containing osmosensor. *Science.* **269**: 554-558.
- Maeda T, Wurgler-Murphy SM & Saito H (1994) A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature.* **369**: 242-245.
- Magliani W, Conti S, de Bernardis F, Gerloni M, Bertolotti D, Mozzoni P, Cassone A & Polonelli L (1997b) Therapeutic potential of antiidiotypic single chain antibodies with yeast killer toxin activity. *Nat Biotechnol.* **15**: 155-158.
- Magliani W, Conti S, Gerloni M, Bertolotti D & Polonelli L (1997a) Yeast killer systems. *Clin Microbiol Rev.* **10**: 369-400.

- Makower M, Bevan EA (1963) The inheritance of the killer character in yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). In: Geerts SJ (ed.) Proceedings 11th International Congress on Genetics, vol I. Pergamon, Oxford, p. 203.
- Manners D, Masson AJ & Patterson JC (1973a) The structure of a  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glucan from yeast cell walls. *Biochem J.* **135**: 19-30.
- Manners D, Masson AJ & Patterson JC (1973b) The structure of a  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-D-glucan from yeast cell walls. *Biochem J.* **135**: 31-36.
- Marchler G, Schüller C, Agam G & Ruis H (1993) A *Saccharomyces cerevisiae* UAS element controlled by protein kinase A activates transcription in response to a variety of stress conditions. *EMBO J.* **12**: 1997-2003.
- Márquez JA & Serrano R (1996) Multiple transduction pathways regulate the sodium-extrusion gene PMR2/ENA1 during salt stress in yeast. *FEBS Lett.* **382**: 89-92.
- Marquina D, Peres C, Caldas FV, Marques JF, Peinado JM & Spercer-Martins I (1992) Characterization of the yeast population in olive brines. *Letters in Appl Microbiol.* **14**: 279-283.
- Marquina D, Toufani S, Llorente P, Santos A & Peinado JM (1997) Killer activity in yeast isolates from olive brines. *Adv Food Sci.* **19**: 41-46.
- Marshall CJ (1994) MAP kinase kinase kinase, MAP kinase kinase and MAP kinase. *Curr Opin Genet Dev.* **4**: 82-89.
- Martinac B, Zhu H, Kubalski A, Zhou X, Culbertson M, Bussey H & Kung C (1990) Yeast K1 killer toxin form ions channels in sensitive yeast spheroplasts and in artificial liposomes. *Proc Natl. Acad. Sci. USA.* **87**: 6228-6232.
- Martinez R, Latreille MT & Mirande M (1991) A PMR2 tandem repeat with a modified C-terminus is located downstream from the KRS1 gene encoding lysyl-tRNA synthetase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet.* **227**: 149-154.
- Martinez P & Persson BL (1998) Identification, cloning and characterization of a derepressible Na<sup>+</sup>-coupled phosphate transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet.* **258**: 628-638.
- Martínez-Pastor MT, Marchler G, Schüller C, Marchler-Bauer A, Ruis H & Estruch F (1996) The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress-response element (STRE). *EMBO J.* **15**: 2227-2235.
- Masih EI, Alie I & Paul B (2000) Can the grey mould disease of the grape-vine be controlled by yeasts? *FEMS Microbiol Lett.* **189**: 233-237.
- Masih EI & Paul B (2002) Secretion of  $\beta$ -1,3-glucanases by the yeast *Pichia membranifaciens* and its possible role in the biocontrol of *Botrytis cinerea* causing grey mould disease of the grapevine. *Curr Microbiol.* **44**: 391-395.
- Masih EI, Slezack-Deschaumes S, Marmaras I, Ait Barka E, Vernet G, Charpentier C, Adholeya A & Paul B (2001) Characterisation of the yeast *Pichia membranifaciens* and its possible use in the biological control of *Botrytis cinerea*, causing the grey mould disease of grapevines. *FEMS Microbiol Lett.* **202**: 227-232.

- Matheos DP, Kingsbury TJ, Ahsan US & Cunningham KW (1997) Tcn1p/Crz1p, a calcineurin-dependent transcription factor that differentially regulates gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* **11**: 3445-3458.
- Mayor S & Riezman H (2004) Sorting GPI-anchored proteins. *Nat Rev., Mol Cell Biol.* **5**: 110-120.
- McConville MJ & Ferguson MA (1993) The structure, biosynthesis and function of glycosylated phosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher eukaryotes. *Biochem J.* **294**: 305-324.
- McCracken DA, Martin VJ, Stark MJR & Bolen PL (1994) The linear-plasmid-encoded toxin produced by the yeast *Pichia acaciae* : characterization and comparison with the toxin *Kluyveromyces lactis*. *Microbiology.* **140**: 425-431.
- Meaden P, Hill K, Wagner J, Slipetz D, Sommer SS & Bussey H (1990) The yeast KRE5 gene encodes a probable endoplasmic reticulum protein required for (1→6)-beta-D-glucan synthesis and normal cell growth. *Mol Cell Biol.* **10**: 3013-3019.
- Mendizabal I, Pascual-Ahuir A, Serrano R & de Larrinoa IF (2001) Promoter sequences regulated by the calcineurin-activated transcription factor Crz1 in the yeast ENA1 gene. *Mol Genet Genomics.* **265**: 801-811.
- Mendizabal I, Rios G, Mulet JM, Serrano R & de Larrinoa IF (1998) Yeast putative transcription factors involved in salt tolerance. *FEBS Lett.* **425**: 323-328.
- Mendoza I, Quintero FJ, Bressan RA, Hasegawa PM & Pardo JM (1996) Activated calcineurin confers high tolerance to ion stress and alters the budding pattern and cell morphology of yeast cells. *J Biol Chem.* **271**: 23061-23067.
- Mendoza I, Rubio F, Rodriguez-Navarro A & Pardo JM (1994) The protein phosphatase calcineurin is essential for NaCl tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* **269**: 8792-8796.
- Middelbeek EJ, Hermans JM & Stumm C (1979) Production, purification and properties of a *Pichia kluyveri* killer toxin. *Anton Leeuw Int J G.* **45**: 437-450.
- Middelbeek EJ, van de Laar HHAM, Hermans JM, Stumm C & Vogels GD (1980) Physiological conditions affecting the sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia kluyveri* killer toxin and energy requirement for toxin action. *Anton Leeuw Int J G.* **46**: 483-497.
- Mikata K & Ueda-Nishimura K (2000) Reclassification of *Pichia membranifaciens* sensu Kurtzman. *Anton Leeuw Int J G.* **77**: 159-171.
- Mitsui K, Ochi F, Nakamura N, Doi Y, Inoue H & Kanazawa H (2004) A novel membrane protein capable of binding the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter (Nha1p) enhances the salinity-resistant cell growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* **279**: 12438-12447.
- Miyahara K, Mizunuma M, Hirata D, Tsuchiya E & Miyakawa T (1996) The involvement of the *Saccharomyces cerevisiae* multidrug resistance transporters Pdr5p and Snq2p in cation resistance. *FEBS Lett.* **399**: 317-320.

- Mizuno K, Nakamura T, Takada K, Sakakibara S & Matsuo H (1987) A membrane-bound, calcium-dependent protease in yeast a-cell cleaving on the carboxyl side of paired basic residues. *Biochem Biophys Res Commun.* **144**: 807-814.
- Molin M, Norbeck J & Blomberg A (2003) Dihydroxyacetone kinases in *Saccharomyces cerevisiae* are involved in detoxification of dihydroxyacetone. *J Biol Chem.* **278**: 1415-1423.
- Montijn RC, van Rinsum J, van Schagen FA & Klis FM (1994) Glucomannoproteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* contain a novel type of carbohydrate side chain. *J Biol Chem.* **269**: 19338-19342.
- Morace G, Archibusacci C, Sestito M & Polonelli L (1984) Strain differentiation of pathogenic yeasts by the killer system. *Mycopathologia.* **84**: 81-85.
- Morace G, Dettori G, Sanguinetti M, Manzara S & Polonelli L (1988) Biotyping of aerobic actinomycetes by modified killer system. *Eur J Epidemiol.* **4**: 99-103.
- Morace G, Manzara S, Dettori G, Fanti F, Conti S, Campani L, Polonelli L & Chezzi C (1989) Biotyping of bacterial isolates using the yeast killer system. *Eur J Epidemiol.* **5**: 303-310.
- Morace G, Tamburrini E, Manzara S, Antinori A, Maiuro G & Dettori G (1990) Epidemiological and clinical aspects of mycoses in patients with AIDS-related pathologies. *Eur J Epidemiol.* **6**: 398-403.
- Mrsă V, Seidl T, Gentzsch M & Tanner W (1997) Specific labelling of cell wall proteins by biotinylation. Identification of four covalently linked O-mannosylated proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* **13**: 1145-1154.
- Mulet JM, Leube MP, Kron SJ, Rios G, Fink GR & Serrano R (1999) A novel mechanism of ion homeostasis and salt tolerance in yeast: the Hal4 and Hal5 protein kinases modulate the Trk1-Trk2 potassium transporter. *Mol Cell Biol.* **19**: 3328-3337.
- Murguía JR, Belles JM & Serrano R (1996) The yeast HAL2 nucleotidase is an *in vivo* target of salt toxicity. *J Biol Chem.* **271**: 29029-29033.
- Munch T, Sonnleitner B & Fiechter A (1992) The decisive role of the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle behaviour for dynamic growth characterization. *J Biotechnol.* **22**: 329-351.
- Nakase T, Jindamorakot S, Mikata K, Ninomiya S, Kawasaki H, Limtong S, Potacharoen W & Tanticharoen M (2007) *Pichia koratensis* sp. nov., a new ascomycetous yeast related to *Pichia acaciae* isolated from insect frass in Thailand. *J Gen Appl Microbiol.* **53**: 345-351.
- Nass R, Cunningham KW & Rao R (1997) Intracellular sequestration of sodium by a novel Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger in yeast is enhanced by mutations in the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. Insights into mechanisms of sodium tolerance. *J Biol Chem.* **272**: 26145-26152.
- Nass R & Rao R (1998) Novel localization of a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger in a late endosomal compartment of yeast. Implications for vacuole biogenesis. *J Biol Chem.* **273**: 21054-21060.

- Nass R & Rao R (1999) The yeast endosomal Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger, Nhx1, confers osmotolerance following acute hypertonic shock. *Microbiology*. **145**: 3221-3228.
- Nathan DF, Vos MH & Lindquist S (1997) In vivo functions of the *Saccharomyces cerevisiae* Hsp90 chaperone. *Proc Natl Acad Sci USA*. **94**: 12949-12956.
- Naumov GL & Naumova TI (1973) Comparative genetics of yeast. XIII Comparative study of killer strains of *Saccharomyces* from different collections. *Genetika*. **9**: 140-145.
- Nelissen B, De Wachter R & Goffeau A (1997) Classification of all putative permeases and other membrane plurispanners of the major facilitator superfamily encoded by the complete genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev*. **21**: 113-134.
- Nelson KL, Raja SM & Buckley T (1997) The glycosylphosphatidylinositol-anchored surface glycoprotein Thy-1 is a receptor for the channel-forming toxin aerolysin. *J Biol Chem*. **272**: 12170-12174.
- Nevitt T, Pereira J, Azevedo Z, Guerreiro P & Rodrigues-Pousada C (2004) Expression of YAP4 in *Saccharomyces cerevisiae* under osmotic stress. *Biochem J*. **379**: 367-374.
- Newman HA, Romeo MJ, Lewis SE, Yan BC, Orlean P & Levin DE (2005) Gpi19, the *Saccharomyces cerevisiae* homologue of mammalian PIG-P, is a subunit of the initial enzyme for glycosylphosphatidylinositol anchor biosynthesis. *Eukaryot Cell*. **4**: 1801-1807.
- Nguyen DT, Alarco AM & Raymond M (2001) Multiple Yap1p-binding sites mediate induction of the yeast major facilitator FLR1 gene in response to drugs, oxidants, and alkylating agents. *J Biol Chem*. **276**: 1138-1145.
- Nishizawa M, Tanabe M, Yabuki N, Kitada K & Toh-E A (2001) Pho85 kinase, a yeast cyclin-dependent kinase, regulates the expression of UGP1 encoding UDP-glucose pyrophosphorylase. *Yeast*. **18**: 239-249.
- Norbeck J & Blomberg A (1997) Metabolic and regulatory changes associated with growth of *Saccharomyces cerevisiae* in 1.4 M NaCl. Evidence for osmotic induction of glycerol dissimilation via the dihydroxyacetone pathway. *J Biol Chem*. **272**: 5544-5554.
- Norbeck J & Blomberg A (2000) The level of cAMP-dependent protein kinase A activity strongly affects osmotolerance and osmo-instigated gene expression changes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. **16**: 121-137.
- Norbeck J, Pahlman AK, Akhtar N, Blomberg A & Adler L (1996) Purification and characterization of two isoenzymes of DL-glycerol-3-phosphatase from *Saccharomyces cerevisiae*. Identification of the corresponding GPP1 and GPP2 genes and evidence for osmotic regulation of Gpp2p expression by the osmosensing mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem*. **271**: 13875-13881.
- Nover L (1991) Induced thermotolerance. In: Nover L (ed.) Heat Shock Response. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, pp. 409-438.
- Nozaki T, Nishimura K, Michael AJ, Maruyama T, Kakinuma Y & Igarashi K (1996) A second gene encoding a putative serine/threonine protein kinase which enhances spermine uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun*. **228**: 452-458.

- Noronha-da-Costa P, Rodrigues C, Spencer-Martins I & Loureiro V (1995) Fatty acid patterns of film-forming yeast and new evidence for the heterogeneity of *Pichia membranaefaciens*. *Lett Appl Microbiol.* **23**: 79-84.
- Nunes C, Usall J, Teixidó N, Torres R & Viñas I (2002) Control of *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* on apples and pears with the combination of *Candida sake* and *Pantoea agglomerans*. *J Food Protect.* **65**: 178-184.
- Nwaka S & Holzer H (1998) Molecular biology of trehalose and the trehalases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* **58**: 197-237.
- Nwaka S, Kopp M & Holzer H (1995) Expression and function of the trehalase genes *NTH1* and *YBR0106* in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* **270**: 10193-10198.
- Oh D & Hopper JE (1990) Transcription of a yeast phosphoglucomutase isozyme gene is galactose inducible and glucose repressible. *Mol Cell Biol.* **10**: 1415-1422.
- Ohta Y, Tsukada Y & Sugimori T (1984) Production purification and characterization of HYI an antiyeast substance produced by *Hansenula saturnus*. *Agric Biol Chem.* **48**: 903-908.
- Okamoto M, Yoko OT, Umemura M, Nakayama K & Jagami Y (2006) Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins are required for the transport of detergent-resistant microdomain-associated membrane proteins Tat2p and Fur4p. *J Biol Chem.* **281**: 4013-4023.
- Okuyama M, Tanimoto Y, Ito T, Anzai A, Mori H, Kimura A, Matsui H & Chiba S (2005) Purification and characterization of the hyper-glycosylated extracellular  $\alpha$ -glucosidase from *Schizosaccharomyces pombe*. *Enzyme Microb Technol.* **37**: 472-480.
- Olsnes S & Phil A (1973) Isolation and properties of abrin: a toxic protein inhibiting protein synthesis. Evidence for different biological functions of its two constituent-peptide chains. *Eur J Biochem.* **35**: 179-185.
- O'Rourke SM & Herskowitz I (2002) A third osmosensing branch in *Saccharomyces cerevisiae* requires the Msb2 protein and functions in parallel with the Sho1 branch. *Mol Cell Biol.* **22**: 4739-4749.
- Orlean P & Menon AK (2007) Thematic review series: lipid posttranslational modifications. GPI anchoring of protein in yeast and mammalian cells, or: how we learned to stop worrying and love glycopospholipids. *J Lipid Res.* **48**: 993-1011.
- O'Rourke SM & Herskowitz I (1998) The Hog1 MAPK prevents cross talk between the HOG and pheromone response MAPK pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* **12**: 2874-2886.
- O'Rourke SM & Herskowitz I (2004) Unique and redundant roles for HOG MAPK pathway components as revealed by whole-genome expression analysis. *Mol Biol Cell.* **15**: 532-542.
- Ota IM & Varshavsky A (1993) A yeast protein similar to bacterial two-component regulators. *Science.* **262**: 566-569.
- Pagé MJ & Di Cera E (2006) Role of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> in enzyme function. *Physiol Rev.* **86**: 1049-1092.

- Pagé N, Gérard-Vincent M, Ménard P, Beaulieu M, Azuma M, Dijkgraaf GJ, Li H, Marcoux J, Nguyen T, Dowse T, Sdicu AM & Bussey H (2003) A *Saccharomyces cerevisiae* genomewide mutant screen for altered sensitivity to K1 killer toxin. *Genetics*. **163**: 875-894.
- Pahlman AK, Granath K, Ansell R, Hohmann S & Adler L (2001) The yeast glycerol 3-phosphatases Gpp1p and Gpp2p are required for glycerol biosynthesis and differentially involved in the cellular responses to osmotic, anaerobic, and oxidative stress. *J Biol Chem*. **276**: 3555-3563.
- Palková Z & Vondrejs V (1996) Killer plaque technique for selecting hybrids and cybrids obtained by induced protoplast fusion. *Methods Mol Biol*. **53**: 339-342.
- Pallier C, Valens M, Puzos V, Fukuhara H, Chéret G, Sor F & Bolotin-Fukuhara M (1993) DNA sequence analysis of a 17 kb fragment of yeast chromosome XI physically localizes the *MRB1* gene and reveals eight new open reading frames including a homologue of the KIN1/KIN2 and SNF1 protein kinases. *Yeast*. **9**: 1149-1155.
- Palpacelli V, Ciani M & Rosini G (1991) Activity of different 'killer' yeasts on strains of yeast species undesirable in the food industry. *FEMS Microbiol Lett*. **68**: 75-78.
- Paluszynski JP, Klassen R & Meinhardt F (2007) *Pichia acaciae* killer system: genetic analysis of toxin immunity. *Appl Environ Microbiol*. **73**: 4373-4378.
- Panaretou B & Piper P (2006) Isolation of yeast plasma membranes. *Methods Mol Biol*. **313**: 27-32.
- Pardo JM, Reddy MP, Yang S, Maggio A, Huh GH, Matsumoto T, Coca MA, Paino-D'Urzo M, Koiwa H, Yun DJ, Watd AA, Bressan RA & Hasegawa PM (1998) Stress signaling through Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein phosphatase calcineurin mediates salt adaptation in plants. *Proc Natl Acad Sci USA*. **95**: 9681-9686.
- Park CM, Banerjee N, Koltin Y & Bruenn JA (1996) The *Ustilago maydis* virally encoded KP1 killer toxin. *Mol Microbiol*. **20**: 957-963.
- Parrou JL, Enjalbert B, Plourde L, Bauche A, Gonzalez B & Francois J (1999) Dynamic responses of reserve carbohydrate metabolism under carbon and nitrogen limitations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. **15**: 191-203.
- Parsell DA, Kowal AS, Singer MA & Lindquist S (1994) Protein disaggregation mediated by heat shock protein Hsp104. *Nature*. **372**: 475-478.
- Parsell DA & Lindquist S (1993) The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu Rev Genet*. **27**: 437-496.
- Pascual-Ahuir A & Proft M (2007) The Sch9 kinase is a chromatin-associated transcriptional activator of osmostress-responsive genes. *EMBO J*. **26**: 3098-3108.
- Pattison-Granberg J & Persson BL (2000) Regulation of cation-coupled high-affinity phosphate uptake in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*. **182**: 5017-5019.
- Pelham HRB, Roberts LM & Lord JM (1992) Toxin entry: how reversible is the secretory pathway? *Trends Cell Biol*. **2**: 183-185.



- Pena MM, Puig S & Thiele DJ (2000) Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* high affinity copper transporter Ctr3. *J Biol Chem.* **275**: 33244-33251.
- Perlman D & Halvorson HO (1983) A putative signal peptidase recognition site and sequence in eukaryotic and prokaryotic signal peptides. *J Mol Biol.* **167**: 391-409.
- Petering JE, Symons MR, Langridge P & Henschke PA (1991) Determination of killer yeast activity in fermenting grape juice by using a marked *Saccharomyces* wine yeast strain. *Appl Environ Microbiol.* **57**: 3232-3236.
- Pfeiffer P & Radler F (1982) Purification and characterization of extracellular and intracellular killer toxin of *Saccharomyces cerevisiae* strain 28. *J Gen Microbiol.* **128**: 2699-2706.
- Pfeiffer P & Radler F (1984) Comparison of the killer toxin of several yeast and the purification of a toxin of type K2. *Arch Microbiol.* **137**: 357-361.
- Philliskirk G & Young (1975) The occurrence of killer character in yeasts of various genera. *Anton Leeuw Int J G.* **41**: 147-151.
- Picard D (2002) Heat-shock protein 90, a chaperone for folding and regulation. *Cell Mol Life Sci.* **59**: 1640-1648.
- Pintar J & Starmer WT (2003) The costs and benefits of killer toxin production by the yeast *Pichia kluyveri*. *Anton Leeuw Int J G.* **83**: 89-97.
- Piper P, Mahé Y, Thompson S, Pandjaitan R, Holyoak C, Egner R, Mühlbauer M, Coote P & Kuchler K (1998) The pdr12 ABC transporter is required for the development of weak organic acid resistance in yeast. *EMBO J.* **17**: 4257-4265.
- Piper PW, Talreja K, Panaretou B, Moradas-Ferreira P, Byrne K, Praekelt UM, Meacock P, Récnacq M & Boucherie H (1994) Induction of major heat-shock proteins of *Saccharomyces cerevisiae*, including plasma membrane Hsp30, by ethanol levels above a critical threshold. *Microbiology.* **140**: 3031-3038.
- Pirkkala L, Nykanen P & Sistonen L (2001) Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. *FASEB J.* **15**: 1118-1131.
- Pittet M & Conzelmann A (2007) Biosynthesis and function of GPI proteins in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta.* **1771**: 405-420.
- Pfund C, Lopez-Hoyo N, Ziegelhoffer T, Schilke BA, Lopez-Buesa P, Walter WA, Wiedmann M & Craig EA (1998) The molecular chaperone Ssb from *Saccharomyces cerevisiae* is a component of the ribosome-nascent chain complex. *EMBO J.* **17**: 3981-3989.
- Platara M, Ruiz A, Serrano R, Palomino A, Moreno F & Ariño J (2006) The transcriptional response of the yeast Na<sup>+</sup>-ATPase ENA1 gene to alkaline stress involves three main signaling pathways. *J Biol Chem.* **281**: 36632-36642.
- Poljak RJ (1994) An idiotope--anti-idiotope complex and the structural basis of molecular mimicking. *Proc Natl Acad Sci USA.* **91**: 1599-1600.
- Polonelli L, Archibusacci C, Sestito M & Morace G (1983) Killer system: a simple method for differentiating *Candida albicans* strains. *J Clin Microbiol.* **17**: 774-780.

- Polonelli L, Conti S & Gerloni M (1991) Antibodies: antibiotic-like antiidiotypic antibodies. *J Med Vet Mycol.* **29**: 235–242.
- Polonelli L, De Bernardis F, Conti S, Boccanera M, Gerloni M, Morace G, Magliani W, Chezzi C & Cassone A (1994) Idiotypic intravaginal vaccination to protect against candidal vaginitis by secretory, yeast killer toxin-like anti-idiotypic antibodies. *J Immunol.* **152**: 3175-3182.
- Polonelli L, Magliani W, Conti S, Bracci L, Lozzi L, Neri P, Adriani D, De Bernardis F & Cassone A (2003) Therapeutic activity of an engineered synthetic killer antiidiotypic antibody fragment against experimental mucosal and systemic candidiasis. *Infect Immun.* **71**: 6205-6212.
- Polonelli L & Morace G (1986) Reevaluation of the yeast killer phenomenon. *J Clin Microbiol.* **24**: 866-869.
- Ponzoni C, Gasparetti C, Goretti M, Turchetti B, Pagnoni UM, Cramarossa MR, Forti L & Buzzini P (2008) Biotransformation of acyclic monoterpenoids by *Debaryomyces* sp., *Kluyveromyces* sp. and *Pichia* sp. strains of environmental origin. *Chem Biodivers.* **5**: 471-483.
- Portillo F (2000) Regulation of plasma membrane H(+)-ATPase in fungi and plants. *Biochim Biophys Acta.* **1469**: 31-42.
- Posas F, Camps M & Arino J (1995) The PPZ protein phosphatases are important determinants of salt tolerance in yeast cells. *J Biol Chem.* **270**: 13036-13041.
- Posas F, Chambers JR, Heyman JA, Hoeffler JP, de Nadal E & Ariño J (2000) The transcriptional response of yeast to saline stress. *J Biol Chem.* **275**: 17249-17255.
- Posas F & Saito H (1998) Activation of the yeast SSK2 MAP kinase kinase by the SSK1 two-component response regulator. *EMBO J.* **17**: 1385-1394.
- Posas F & Saito H (1997) Osmotic activation of the HOG MAPK pathway via Ste11p MAPKKK: scaffold role of Pbs2p MAPKK. *Science.* **276**: 1702-1705.
- Posas F, Takekawa M & Saito H (1998) Signal transduction by MAP kinase cascades in budding yeast. *Curr Opin Microbiol.* **1**: 175-182.
- Posas F, Wurgler-Murphy SM, Maeda T, Witten EA, Thai TC & Saito H (1996) Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 “two-component” osmosensor. *Cell.* **86**: 865-875.
- Praekelt UM & Meacock PA (1990) HSP12, a new small heat shock gene of *Saccharomyces cerevisiae*: analysis of structure, regulation and function. *Mol Gen Genet.* **223**: 97-106.
- Prior C, Potier S, Souciet JL & Sychrova H (1996) Characterization of the NHA1 gene encoding a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-antiporter of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **387**: 89-93.
- Proft M, Pascual-Ahuir A, de Nadal E, Arino J, Serrano R & Posas F (2001) Regulation of the Sko1 transcriptional repressor by the Hog1 MAP kinase in response to osmotic stress. *EMBO J.* **20**: 1123-1133.

- Proft M & Serrano R (1999) Repressors and upstream repressing sequences of the stress-regulated *ENA1* gene in *Saccharomyces cerevisiae*: bZIP protein Sko1p confers HOG-dependent osmotic regulation. *Mol Cell Biol.* **19**: 537-546.
- Proft M & Struhl K (2002) Hog1 kinase converts the Sko1-Cyc8-Tup1 repressor complex into an activator that recruits SAGA and SWI/SNF in response to osmotic stress. *Mol Cell.* **9**: 1307-1317.
- Proft M & Struhl K (2004) MAP kinase-mediated stress relief that precedes and regulates the timing of transcriptional induction. *Cell.* **118**: 351-361.
- Provost F, Polonelli L, Conti S, Fisicaro P, Gerloni M & Boiron P (1995) Use of yeast killer system to identify species of the *Nocardia asteroides* complex. *J Clin Microbiol.* **33**: 8-10.
- Puerto JL, Garcia-Martos P, Saldarreaga A, Ruiz-Aragon J, Garcia-Agudo R & Aoufi S (2002) First report of urinary tract infection due to *Pichia ohmeri*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **21**: 630-631.
- Quintero FJ, Blatt MR & Pardo JM (2000) Functional conservation between yeast and plant endosomal Na(+)/H(+) antiporters. *FEBS Lett.* **471**: 224-228.
- Radler F, Herzberger S & Schwarz P (1993) Investigation of a killer strain of *Zygosaccharomyces bailii*. *J Gen Microbiol.* **139**: 495-500.
- Radler F, Schmitt MJ & Meyer B (1990) Killer toxin of *Hanseniaspora uvarum*. *Arch Microbiol.* **154**: 175-178.
- Ram AFJ, van den Ende H & Klis FM (1998) Green fluorescent protein-cell wall fusion proteins are covalently incorporated into the cell wall of *Sacchaomyces cerevisiae*. *FEMS Micobiol Lett.* **162**: 249-255.
- Ramos J, Alijo R, Haro R & Rodriguez-Navarro A (1994) TRK2 Is not a low-affinity potassium transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* **176**: 249-252.
- Ramos J, Contreras P & Rodriguez-Navarro A (1985) A potassium transport mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol.* **143**: 88-93.
- Ramos J, Haro R & Rodriguez-Navarro A (1990) Regulation of potassium fluxes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta.* **1029**: 211-217.
- Ramos J & Rodriguez-Navarro A (1986) Regulation and interconversion of the potassium transport systems of *Saccharomyces cerevisiae* as revealed by rubidium transport. *Eur J Biochem.* **154**: 307-311.
- Rantsiou K, Urso R, Dolci P, Comi G & Cocolin L (2008) Microflora of Feta cheese from four Greek manufacturers. *Int J Food Microbiol.* **126**: 36-42.
- Raposo R, Gómez V, Urrutia T & Melgarejo P (2000) Fitness of *Botrytis cinerea* associated with dicarboximide resistance. *Phytopathology.* **90**: 1246-1249.
- Reed RH, Chudek JA, Foster R & Gadd GM (1987) Osmotic significance of glycerol accumulation in exponentially growing yeasts. *Appl Environ Microbiol.* **17**: 95-107.

- Reid JD, Lukas W, Shafaatian R, Bertl A, Scheurmann-Kettner C, Guy HR & North RA (1996) The *S. cerevisiae* outwardly rectifying potassium channel (*DUK1*) identifies a new family of channels with duplicated pore domains. *Receptors and Channels*. **4**: 51-62.
- Reiser V, Raitt DC & Saito H (2003) Yeast osmosensor Sln1 and plant cytokinin receptor Cre1 respond to changes in turgor pressure. *J Cell Biol*. **161**: 1035-1040.
- Reiser V, Salah SM & Ammerer G (2000) Polarized localization of yeast Pbs2 depends on osmostress, the membrane protein Sho1 and Cdc42. *Nat Cell Biol*. **2**: 620-627.
- Reiter J, Herker E, Madeo F & Schmitt MJ (2005) Viral killer toxins induce caspase-mediated apoptosis in yeast. *J Cell Biol*. **168**: 353-358.
- Rep M, Krantz M, Thevelein MJ & Hohmann S (2000) The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shock. Hot1p and Msn2p/Msn4p are required for the induction of subsets of high osmolarity glycerol pathway-dependent genes. *J Biol Chem*. **275**: 8290-8300.
- Rep M, Reiser V, Gartner U, Thevelein MJ, Hohmann S, Ammerer G & Ruis H (1999) Osmotic stress-induced gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* requires Msn1p and the novel nuclear factor Hot1p. *Mol Cell Biol*. **19**: 5474-5485.
- Riffer F, Eisfeld K, Breinig F & Schmitt MJ (2002) Mutational analysis of K28 preprotoxin processing in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*. **148**: 1317-1328.
- Rigaud JL, Pitard B & Levy D (1995) Reconstitution of membrane proteins into liposomes: application to energy-transducing membrane proteins. *Biochim Biophys Acta*. **1231**: 223-246.
- Rivetta A, Slayman C & Kuroda T (2005) Quantitative modeling of chloride conductance in yeast TRK potassium transporters. *Biophys J*. **89**: 2412-2426.
- Roberts RL, Bowers B, Slater ML & Cabib E (1983) Chitin synthesis and localization in cell division cycle mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. **3**: 922-930.
- Robinson MJ & Cobb MH (1997) Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol*. **9**: 180-186.
- Rocha LL, de Aguiar Cordeiro R, Cavalcante RM, do Nascimento RF, Martins SC, Santaella ST & Melo VM (2007) Isolation and characterization of phenol-degrading yeasts from an oil refinery wastewater in Brazil. *Mycopathologia*. **164**: 183-188.
- Rodríguez A, de la Cera T, Herrero P & Moreno F (2001) The hexokinase 2 protein regulates the expression of the GLK1, HXK1 and HXK2 genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J*. **355**: 625-631.
- Rodriguez-Navarro A & Ortega MD (1982) The mechanism of sodium efflux in yeast. *FEBS Lett*. **138**: 205-208.
- Rodriguez-Navarro A & Ramos J (1984) Dual system for potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*. **159**: 940-945.

- Roosen J, Engelen K, Marchal K, Mathys J, Griffioen G, Camerini E, Thevelein JM, DeVirgilio C, De Moor B & Winderickx J (2005) PKA and Sch9 control a molecular switch important for the proper adaptation to nutrient availability. *Mol Microbiol.* **55**: 862-880.
- Rosini G (1984) Assessment of dominance of added yeast with fermentation and origin of *Saccharomyces cerevisiae* in wine making. *J Gen Appl Microbiol.* **30**: 249-256.
- Rossignol T, Logue ME, Reynolds K, Grenon M, Lowndes NF & Butler G (2007) Transcriptional response of *Candida parapsilosis* following exposure to farnesol. *Antimicrob Agents Chemother.* **51**: 2304-2312.
- Ruissen ALA, Groenink J, Helmerhorst EJ, Walgreen-Weterings E, Van't Hof W, Veerman ECI & Amerongen AVN (2001) Effects of histatin 5 and derived peptides on *Candida albicans*. *Biochem J.* **356**: 361-368.
- Ruiz A & Ariño J (2007) Function and regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* ENA sodium ATPase system. *Eukaryot Cell.* **6**: 2175-2183.
- Ruiz A, Yenush L & Arino J (2003) Regulation of ENA1 Na(+)-ATPase gene expression by the Ppz1 protein phosphatase is mediated by the calcineurin pathway. *Eukaryot Cell.* **2**: 937-948.
- Sales K, Brandt W, Rumbak E & Lindsey G (2000) The LEA-like protein HSP 12 in *Saccharomyces cerevisiae* has a plasma membrane location and protects membranes against desiccation and ethanol-induced stress. *Biochim Biophys Acta.* **1463**: 267-278.
- Sánchez Y, Taulien J, Borkovich KA & Lindquist S (1992) Hsp104 is required for tolerance to many forms of stress. *EMBO J.* **11**: 2357-2364.
- Santoro N & Thiele DJ (1997) Oxidative stress responses in the yeast. In: Hohmann S & Mager WH (eds.) *Yeast Stress Responses*. Molecular Biology Intelligence Unit, RG Landes Company, Austin (TX), pp. 172-211.
- Santos A, Alvarez MD, San Mauro M, Abrusci C & Marquina D (2005) The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to *Pichia membranifaciens* killer toxin. *J Biol Chem.* **280**: 41881-41892.
- Santos A & Marquina D (2004a) Ion channel activity by *Pichia membranifaciens* killer toxin. *Yeast.* **21**: 151-162.
- Santos A & Marquina D (2004b) Killer toxin of *Pichia membranifaciens* and its possible use as a biocontrol agent against grey mould disease of grapevine. *Microbiology.* **150**: 2527-2537.
- Santos A, Marquina D, Barroso J & Peinado JM (2002) (1→6)-β-D-glucan as cell wall binding site for *Debaryomyces hansenii* killer toxin. *Lett Appl Microbiol.* **34**: 95-99.
- Santos A, Marquina D, Leal JA & Peinado JM (2000) (1→6)-β-D-glucan as cell wall receptor for *Pichia membranifaciens* killer toxin. *Appl Environ Microbiol.* **66**: 1809-1813.
- Santos A, San Mauro M, Abrusci C & Marquina D (2007) Cwp2p, the plasma membrane receptor for *Pichia membranifaciens* killer toxin. *Mol Microbiol.* **64**: 831-843.

- Santos A, Sánchez A & Marquina D (2004) Yeast as biological agents to control *Botrytis cinerea*. *Microbiological Research*. **159**: 331-338.
- Satyanarayana C, Schroder-Kohne S, Craig EA, Schu PV & Horst M (2000) Cytosolic Hsp70s are involved in the transport of aminopeptidase 1 from the cytoplasm into the vacuole. *FEBS Lett*. **470**: 232-238.
- Sawant AD, Abdelal AT & Ahearn DG (1988) Anti-*Candida albicans* activity of *Pichia anomala* as determined by a growth rate reduction assay. *Appl Environ Microbiol*. **54**: 1099-1103.
- Sawant AD, Abdelal AT & Ahearn DG (1989) Purification and characterization of the anti-*Candida* toxin of *Pichia anomala* WC 65. *Antimicrob Agents Chemother*. **33**: 48-52.
- Schirmer EC, Glover JR, Singer MA & Lindquist S (1996) HSP100/Clp proteins: a common mechanism explains diverse functions. *Trends Biochem Sci*. **21**: 289-296.
- Schmitt MJ (1995) Cloning and expression of a cDNA copy of the viral K28 killer toxin gene in yeast. *Mol Gen Genet*. **246**: 236-246.
- Schmitt MJ & Breinig F (2002) The viral killer system in yeast: from molecular biology to application. *FEMS Microbiol Rev*. **26**: 257-276.
- Schmitt MJ & Breinig F (2006) Yeast viral killer toxins: lethality and self-protection. *Nat Rev Microbiol*. **4**: 212-221.
- Schmitt MJ, Brendel M, Schwarz R & Radler F (1989) Inhibition of DNA synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* by yeast toxin K28. *J Gen Microbiol*. **135**: 1529-1535.
- Schmitt MJ & Einfeld K (1999) Killer viruses in *S. cerevisiae* and their general importance in understanding eucaryotic cell biology. *Recent Res Devel Virol*. **1**: 525-545.
- Schmitt MJ, Klavehn P, Wang J, Schöning I & Tipper DJ (1996) Cell cycle studies on the mode of action of yeast K28 killer toxin. *Microbiology*. **142**: 2655-2662.
- Schmitt AP & McEntee K (1996) Msn2p, a zinc finger DNA-binding protein, is the transcriptional activator of the multistress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA*. **93**: 5777-5782.
- Schmitt MJ & Radler F (1987) Mannoprotein of the yeast cell wall as primary receptor for the killer toxin of *Saccharomyces cerevisiae* strain 28. *J Gen Microbiol*. **133**: 3347-3354.
- Schmitt MJ & Radler F (1988) Molecular structure of the cell wall receptor for killer toxin KT28 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*. **170**: 2192-2196.
- Schmitt MJ & Radler F (1989) Purification of yeast killer toxin KT28 by receptor-mediated affinity chromatography. *J Chromatogr*. **469**: 448-452.
- Schmitt MJ & Tipper DJ (1990) K28, a unique double-stranded RNA killer virus of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. **10**: 4807-4815.
- Schmitt MJ & Tipper DJ (1995) Sequence of the M28 dsRNA: preprotoxin is processed to an  $\alpha/\beta$  heterodimeric protein toxin. *Virology*. **213**: 341-351.

- Schuller C, Brewster JL, Alexander MR, Gustin MC & Ruis H (1994) The HOG pathway controls osmotic regulation of transcription via the stress response element (STRE) of the *Saccharomyces cerevisiae* CTT1 gene. *EMBO J.* **13**: 4382-4389.
- Schwartz MA & Madhani HD (2004) Principles of MAP kinase signaling specificity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Genet.* **38**: 725-478.
- Scott MP, Fostel JM & Pardue ML (1980) A new type of virus from cultured Drosophila cells: characterization and use in studies of the heat-shock response. *Cell.* **22**: 929-941.
- Séguy N, Aliouat EM, Dei-Cas E, Polonelli L, Camus D & Cailliez JC (1994) Susceptibility of *Pneumocystis carinii* to a *Pichia anomala* killer toxin. *J Eukaryot Microbiol.* **41**: 109S.
- Séguy N, Cailliez JC, Polonelli L, Dei-Cas E & Camus D (1996) Inhibitory effect of a *Pichia anomala* killer toxin on *Pneumocystis carinii* infectivity to the SCID mouse. *Parasitol Res.* **82**: 114-116.
- Séguy N, Polonelli L, Dei-Cas E & Cailliez JC (1997) Monoclonal killer toxin-like antiidiotypic antibodies to control rat-pneumocystosis. *J Eukaryot Microbiol.* **44**: 37S.
- Seki T, Choi EH & Ryu D (1985) Construction of Killer Wine Yeast Strain. *Appl Environ Microbiol.* **49**: 1211-1215.
- Selvakumar D, Karim N, Miyamoto M, Furuichi Y & Komiyama T (2006a) Recombinant single-chain anti-idiotypic antibody: an effective fungal beta-1,3-glucan synthase inhibitor. *Biol Pharm Bull.* **29**: 1848-1853
- Selvakumar D, Miyamoto M, Furuichi Y & Komiyama T (2006b) Inhibition of fungal beta-1,3-glucan synthase and cell growth by HM-1 killer toxin single-chain anti-idiotypic antibodies. *Antimicrob Agents Chemother.* **50**: 3090-3097.
- Selvakumar D, Zhang QZ, Miyamoto M, Furuichi Y & Komiyama T (2006c) Identification and characterization of a neutralizing monoclonal antibody for the epitope on HM-1 killer toxin. *J Biochem.* **139**: 399-406.
- Serrano R (1983) In vivo glucose activation of the yeast plasma membrane ATPase. *FEBS Lett.* **156**: 11-14.
- Serrano R (1984) Plasma membrane ATPase of fungi and plants as a novel type of proton pump. *Curr Top Cell Regul.* **23**: 87-126.
- Serrano R (1989) Knowledge about ATPases ignored. *Trends Biochem Sci.* **14**: 361-362.
- Serrano R, Kielland-Brandt MC & Fink GR (1986) Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with (Na<sup>++</sup> K<sup>+</sup>), K<sup>+</sup>- and Ca<sup>2+</sup>-ATPases. *Nature.* **319**: 689-693.
- Serrano R, Mulet JM, Rios G, Marquez JA, de Larrinoa IF, Leube MP, Mendizabal I, Pascual-Ahuir A, Proft M, Ros R & Montesinos C (1999) A glimpse of the mechanisms of ion homeostasis during salt stress in plants. *J Exp Bot.* **50**: 1023-1036.

- Serrano R, Ruiz A, Bernal D, Chambers JR & Arino J (2002) The transcriptional response to alkaline pH in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for calcium-mediated signalling. *Mol Microbiol.* **46**: 1319-1333.
- Seth A, Gonzalez FA, Gupta S, Raden DL & Davis RJ (1992) Signal transduction within the nucleus by mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem.* **267**: 24796-24804.
- Shi C, Kaminskyj S, Caldwell S & Loewen MC (2007) A role for a complex between activated G protein-coupled receptors in yeast cellular mating. *Proc Natl Acad Sci USA.* **104**: 5395-5400.
- Shibuya H & Kikuchi T (2008) Purification and characterization of recombinant endoglucanases from the pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus*. *Biosci Biotechnol Biochem.* **72**: 1325-1332.
- Shimizu K, Adachi T, Kitano K, Shimazaki T, Totsuka A, Hara S & Dittrich H (1985) Killer properties of wine yeasts and characterization of killer yeasts. *J Ferment Technol.* **63**: 421-429.
- Shitamukai A, Hirata D, Sonobe S & Miyakawa T (2004) Evidence for antagonistic regulation of cell growth by the calcineurin and high osmolarity glycerol pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* **279**: 3651-3661.
- Shulga N, James P, Craig EA & Goldfarb DS (1999) A nuclear export signal prevents *Saccharomyces cerevisiae* Hsp70 Ssb1p from stimulating nuclear localization signal-directed nuclear transport. *J Biol Chem.* **274**: 16501-16507.
- Siderius M, Van Wuytswinkel O, Reijenga KA, Kelders M & Mager WH (2000) The control of intracellular glycerol in *Saccharomyces cerevisiae* influences osmotic stress response and resistance to increased temperature. *Mol Microbiol.* **36**: 1381-1390.
- Singer MA & Lindquist S (1998a) Multiple effects of trehalose on protein folding *in vitro* and *in vivo*. *Mol Cell.* **1**: 639-648.
- Singer MA & Lindquist S (1998b) Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the Yin and Yang of trehalose. *Trends Biotechnol.* **16**: 460-468.
- Singh KK (2000) The *Saccharomyces cerevisiae* Sln1p-Ssk1p two-component system mediates response to oxidative stress and in an oxidant-specific fashion. *Free Radic Biol Med.* **29**: 1043-1050.
- Siniosoglou S, Hurt EC & Pelham HR (2000) Psr1p/Psr2p, two plasma membrane phosphatases with an essential DXDX(T/V) motif required for sodium stress response in yeast. *J Biol Chem.* **275**: 19352-19360.
- Sipos G, Puoti A & Conzelmann A (1994) Glycosylphosphatidylinositol membrane anchors in *Saccharomyces cerevisiae*: absence of ceramides from complete precursor glycolipids. *EMBO J.* **13**: 2789-2796.
- Siderius M, Rots E & Mager WH (1997) High-osmolarity signalling in *Saccharomyces cerevisiae* is modulated in a carbon-source-dependent fashion. *Microbiology.* **143**: 3241-3250.
- Skipper N & Bussey H (1977) Mode of action of yeast toxins: energy requirement for *Saccharomyces cerevisiae* killer toxin. *J Bacteriol.* **129**: 668-677.



- Skipper N, Thomas DY & Lau PC (1984) Cloning and sequencing of the preprotoxin-coding region of the yeast M1 double-stranded RNA. *EMBO J.* **3**: 107-111.
- Skrzypek M, Lester RL & Dickson RC (1997) Suppressor gene analysis reveals an essential role for sphingolipids in transport of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* **179**: 1513-1520.
- Skrzypek M, Lester RL, Spielman P, Zingg N, Shelling J & Dickson RC (2000) Dominant suppressor bypasses the sphingolipid requirement for growth of *Saccharomyces* cells at low pH: role of the *CWP2* gene. *Curr Genet.* **38**: 191-201.
- Smits GJ, Schenkman LR, Brul S, Pringle JR & Klis FM (2006) Role of cell cycle-regulated expression in the localized incorporation of cell wall proteins in yeast. *Mol Biol Cell.* **17**: 3267-3280.
- Sobering AK, Watanabe R, Romeo MJ, Yan BC, Specht CA, Orlean P, Riezman H & Levin DE (2004) Yeast Ras regulates the complex that catalyzes the first step in GPI-anchor biosynthesis at the ER. *Cell.* **117**: 637-648.
- Somers JM & Bevan EA (1969) The inheritance of the killer character in yeast. *Genetic Res Camb.* **13**: 71-83.
- Sommer SS & Wickner RB (1982) Co-curing of plasmids affecting killer double-stranded RNAs of *Saccharomyces cerevisiae*: [HOK], [NEX], and the abundance of L are related and further evidence that M1 requires L. *J Bacteriol* **150**: 545-551.
- Sorger PK (1990) Yeast heat shock factor contains separable transient and sustained response transcriptional activators. *Cell.* **62**: 793-805.
- Sorger PK (1991) Heat shock factor and heat shock response. *Cell.* **65**: 363-366.
- Sorger PK, Lewis MJ & Pelham HRB (1987) Heat shock factor is regulated differently in yeast and HeLa cells. *Nature.* **329**: 81-84.
- Sossin WS, Fisher JM & Scheller RH (1989) Cellular and molecular biology of neuropeptide processing and packaging. *Neuron.* **2**: 1407-1417.
- Spellman PT, Sherlock G, Zhang MQ, Iyer VR, Anders K, Eisen MB, Brown PO, Botstein D & Futcher B (1998) Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization. *Mol Biol Cell.* **9**: 3273-3297.
- Stark MJR & Boyd A (1986) The killer toxin of *Kluyveromyces lactis*: characterization of the toxin subunits and identification of the genes which encode them. *EMBO J.* **5**: 1995-2002.
- Starmer WT, Ganter PF & Aberdeen V (1987) The ecological role of killer yeast in natural communities of yeast. *Can J Microbiol.* **33**: 783-796.
- Stathopoulos AM & Cyert MS (1997) Calcineurin acts through the CRZ1/TCN1-encoded transcription factor to regulate gene expression in yeast. *Genes Dev.* **11**: 3432-3444.
- Stratford M (1994) Another brick in the wall? Recent developments concerning the yeast cell envelope. *Yeast.* **10**: 1741-1752.

- Studte P, Zink S, Jablonowski D, Bär C, von der Haar T, Tuite MF & Schaffrath R (2008) tRNA and protein methylase complexes mediate zymocin toxicity in yeast. *Mol Microbiol.* **69**: 1266-1277.
- Stumm C, Hermans JMH, Middelbeek EJ, Croes AF & de Vries GJ (1977) Killer-sensitive relationships in yeasts from natural habitats. *Anton Leeuw Int J G.* **43**: 125-128.
- Sturley SL, Elliot Q, LeVitre J, Tipper DJ & Bostian KA (1986) Mapping of functional domains within the *Saccharomyces cerevisiae* type 1 killer preprotoxin. *EMBO J.* **5**: 3381-3389.
- Su LJ, Chang CW, Wu YC, Chen KC, Lin CJ, Liang SC, Lin CH, Whang-Peng J, Hsu SL, Chen CH & Huang CY (2007) Selection of DDX5 as a novel internal control for Q-RT-PCR from microarray data using a block bootstrap re-sampling scheme. *BMC Genomics.* **8**: 140-151.
- Sugisaki Y, Gunge N, Sakaguchi K, Yamasaki M & Tamura G (1984) Characterization of a novel killer toxin encoded by a double-stranded linear DNA plasmid of *Kluyveromyces lactis*. *Eur J Biochem.* **141**: 241-245.
- Sütterlin C, Escribano MV, Geroid P, Maeda Y, Mazon MJ, Kinoshita T, Schwarz RT & Riezman H (1998) *Saccharomyces cerevisiae* GPI10, the functional homologue of human PIG-B, is required for glycosylphosphatidylinositol-anchor synthesis. *Biochem J.* **332**: 153-159.
- Suzuki C (1999) Secretion of a protoxin post-translationally controlled by NaCl in a halotolerant yeast, *Pichia farinosa*. *Yeast.* **15**: 123-131.
- Suzuki C, Ando Y & Machida S (2001) Interaction of SMKT, a killer toxin produced by *Pichia farinosa*, with the yeast cell membranes. *Yeast.* **18**: 1471-1478.
- Suzuki C, Kashiwagi T, Tsuchiya F, Kunishima N, Morikawa K, Nikkuni S & Arata Y (1997) Circular dichroism analysis of the interaction between the alpha and beta subunits in a killer toxin produced by a halotolerant yeast, *Pichia farinosa*. *Protein Eng.* **10**: 99-101.
- Suzuki C & Nikkuni S (1994) The primary and subunit structure of a novel type killer toxin produced by a halotolerant yeast, *Pichia farinosa*. *J Biol Chem.* **269**: 3041-3046.
- Suzuki C & Shimma YI (1999) P-type ATPase spf1 mutants show a novel resistance mechanism for the killer toxin SMKT. *Mol Microbiol.* **32**: 813-823.
- Sychrová H, Ramírez J & Peña A (1999) Involvement of Nha1 antiporter in regulation of intracellular pH in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett.* **171**: 167-172.
- Taj-Aldeen SJ, Doiphode SH & Han XY (2006) *Kodamaea (Pichia) ohmeri* fungaemia in a premature neonate. *J Med Microbiol.* **55**: 237-239.
- Takasuka T, Komiyama T, Furuichi Y & Watanabe T (1995) Cell wall synthesis specific cytotoxic effect of *Hansenula mrakii* toxin-1 on *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Mol Biol Res.* **41**: 575-581.

- Takita MA & Castilho-Valavicius B (1993) Absence of cell wall chitin in *Saccharomyces cerevisiae* leads to resistance to *Kluyveromyces lactis* killer toxin. *Yeast*. **9**: 589-598.
- Taron CH, Wieldman JM, Grimme SJ & Orlean P (2000) Glycosylphosphatidylinositol biosynthesis defects in Gpi11p- and Gpi13p-deficient yeast suggest a branched pathway and implicate Gpi13p in phosphoethanolamine transfer to the third mannose. *Mol Biol Cell*. **11**: 1611-1630.
- Teige M, Scheikl E, Reiser V & Ammerer G (2001) Rck2, a member of the calmodulin-protein kinase family, links protein synthesis to high osmolarity MAP kinase signaling in budding yeast. *Proc Natl Acad Sci USA*. **98**: 5625-5630.
- Temple MD, Perrone GG & Dawes IW (2005) Complex cellular responses to reactive oxygen species. *Trends Cell Biol*. **15**: 319-326.
- Thevelein JM (1984) Regulation of trehalose mobilization in fungi. *Microbiol Rev*. **48**: 42-59.
- Thomas PS (1980) Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc Natl Acad Sci USA*. **77**: 5201-5205.
- Tipper DJ & Bostian KA (1984) Double-stranded ribonucleic acid killer system in yeasts. *Microbiol Rev*. **48**: 125-156.
- Tipper DJ & Schmitt MJ (1991) Yeast dsRNA viruses: replication and killer phenotypes. *Mol Microbiol*. **5**: 2331-2338.
- Toh-e A & Oguchi T (1998) Isolation and characterization of the yeast las21 mutants, which are sensitive to a local anesthetic, tetracaine. *Genes Genet Syst*. **73**: 365-375.
- Toh-e A, Yasunaga S, Nisogi H, Tanaka K, Oguchi T & Matsui Y (1993) Three yeast genes, PIR1, PIR2 and PIR3, containing internal tandem repeats, are related to each other, and PIR1 and PIR2 are required for tolerance to heat shock. *Yeast*. **9**: 481-494.
- Toi A & Douglas HC (1964) The effect of mutation on two forms of phosphoglucomutase in *Saccharomyces*. *Biochim Biophys Acta*. **92**: 513-520.
- Toone WM & Jones N (1999) AP-1 transcription factors in yeast. *Curr Opin Genet Dev*. **9**: 55-61.
- Trott A & Morano KA (2003) The yeast response to heat shock. In: Hohmann S & Mager PWH (eds.) *Yeast stress responses*. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany. pp. 71-119.
- Valis K, Masek T, Novotná D, Pospisek M & Janderová (2006) Immunity to killer toxin K1 is connected with the Golgi-to-vacuole protein degradation pathway. *Folia Microbiol*. **51**: 196-202.
- van der Vaart JM, Caro LH, Chapman JW, Klis FM & Verrips CT (1995) The retention mechanism of cell wall proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. Wall-bound Cwp2p is beta-1,6-glucosylated. *Biochim Biophys Acta*. **3**: 206-214.

- van der Vaart JM, te-Biesebeke R, Chapman JW, Toschka HW, Klis FM & Verrips CT (1997) Comparison of cell wall proteins of *Saccharomyces cerevisiae* as anchors for cell surface expression of heterologous proteins. *Appl Environ Microbiol.* **63**: 615-620.
- Van der Walt JP & Scott DB (1971) *Pichi xylopsoci*, a new yeast from south african insect sources. *Mycopathologia et Mycologia applicata.* **44**: 321-324.
- Van Etten J, Lane L, Gonzales C, Partridge J & Vivader A (1976) Comparative properties of bacteriophage 06 and 46 nucleocapsid. *J Virol.* **18**: 652-658.
- Van Laere A (1989) Trehalose, reserve and for stress metabolite? *FEMS Microbiol Rev.* **63**: 201-210.
- van Uden N & Buckley HR (1970) *Candida valida* (Leberle) Uden et Buckley nov. comb. In: Lodder J (ed.) *The Yeasts a Taxonomic Study* (2<sup>nd</sup> edition). North-Holland, Amsterdam, pp 1066-1068.
- van Vuuren HJJ & Wingfield BD (1986) Killer yeasts-Cause of stuck fermentations in a wine cellar. South Africa. *J Enol Viticult.* **7**: 114-118.
- van Weert AW, Geuze HJ & Stoorvogel W (1997) Heterogeneous behavior of cells with respect to induction of retrograde transport from the trans-Golgi network to the Golgi upon inhibition of the vacuolar proton pump. *Eur J Cell Biol.* **74**: 417-423.
- Varela JCS, Praekelt UM, Meacock PA, Planta RJ & Mager WH (1995) The *Saccharomyces cerevisiae* HSP12 gene is activated by the High-Osmolarity Glycerol pathway and negatively regulated by protein kinase A. *Mol Cell Biol.* **15**: 6232-6245.
- Varela JCS, van Beekvelt CA, Planta RJ & Mager WH (1992) Osmostress-induced changes in yeast gene expression. *Mol Microbiol.* **6**: 2183-2190.
- Vergani P, Miosga T, Jarvis SM & Blatt MR (1997) Extracellular K<sup>+</sup> and Ba<sup>2+</sup> mediate voltage-dependent inactivation of the outward-rectifying K<sup>+</sup> channel encoded by the yeast gene TOK1. *FEBS Lett.* **405**: 337-344.
- Viana F, Gil JV, Genovés S, Vallés S & Manzanares P (2008) Rational selection of non-*Saccharomyces* wine yeasts for mixed starters based on ester formation and enological traits. *Food Microbiol.* **25**: 778-785.
- Villa-Carvajal M, Querol A & Belloch C (2006) Identification of species in the genus *Pichia* by restriction of the internal transcribed spacers (ITS1 and ITS2) and the 5.8S ribosomal DNA gene. *Anton Leeuw Int J G.* **90**: 171-181.
- Viladevall L, Serrano R, Ruiz A, Domenech G, Giraldo J, Barcelo A & Arino J (2004) Characterization of the calcium-mediated response to alkaline stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* **279**: 43614-43624.
- Vodkin MH, Katterman F & Fink GR (1974) Yeast killer mutants with altered double-stranded ribonucleic acid. *J Bacteriol.* **117**: 681-686.
- Vondrejs V, Janderová B, Valášek L (1996) Yeast killer K1 and its exploitation in genetic manipulations. *Folia Microbiol.* **41**: 379-394.
- Walker GM, McLeod AH & Hodgson VJ (1995) Interactions between killer yeasts and pathogenic fungi. *FEMS Microbiol Lett.* **127**: 213-222.

- Watson K (1990) Microbial stress proteins. *Adv Microb Physiol.* **31**: 183-223.
- Weiler F & Schmitt MJ (2003) Zygoicin, a secreted antifungal toxin of the yeast *Zygosaccharomyces bailii*, and its effect on sensitive fungal cells. *FEMS Yeast Res.* **3**: 69-76.
- Werner-Washburne M, Stone DE & Craig EA (1987) Complex interactions among members of an essential subfamily of hsp70 genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* **7**: 2568-2577.
- Westfall PJ & Thorner J (2006) Analysis of mitogen-activated protein kinase signaling specificity in response to hyperosmotic stress: use of an analog-sensitive HOG1 allele. *Eukaryot Cell.* **5**: 1215-1228.
- White JH, Butler AR & Stark JR (1989) *Kluyveromyces lactis* toxin does not inhibit yeast adenyl cyclase. *Nature.* **341**: 666-668.
- Wickner RB (1992) Double-stranded RNA viruses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Microbiol.* **46**: 347-375.
- Wickner RB (1996) Double-stranded RNA viruses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev.* **60**: 250-265.
- Wickner RB (1993) Double-stranded RNA virus replication and packaging. *J Biol Chem.* **268**: 3797-3800.
- Wiemken A (1990) Trehalose in yeast, stress protectant rather than reserve carbohydrate. *Anton Leeuw Int J G.* **58**: 209-217.
- Wiederrecht G, Seto D & Parker CS (1988) Isolation of the gene encoding the *S. cerevisiae* heat shock transcription factor. *Cell.* **54**: 841-853.
- Wieland J, Nitsche AM, Strayle J, Steiner H & Rudolph HK (1995) The PMR2 gene cluster encodes functionally distinct isoforms of a putative Na<sup>+</sup> pump in the yeast plasma membrane. *EMBO J.* **14**: 3870-3882.
- Willer M, Jermy AJ, Young BP & Stirling CJ (2003) Identification of novel protein-protein interactions at the cytosolic surface of the Sec63 complex in the yeast ER membrane. *Yeast.* **20**: 133-148.
- Winderickx J, de Winde JH, Crauwels M, Hino A, Hohmann S, Van Dijck P & Thevelein JM (1996) Regulation of genes encoding subunits of the trehalose synthase complex in *Saccharomyces cerevisiae*: novel variations of STRE-mediated transcription control? *Mol Gen Genet.* **252**: 470-482.
- Winkler A, Arkind C, Mattison CP, Burkholder A, Knoche K & Ota I (2002) Heat stress activates the yeast high-osmolarity glycerol mitogen-activated protein kinase pathway, and protein tyrosine phosphatases are essential under heat stress. *Eukaryot Cell.* **1**: 163-173.
- Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA & Rasmussen RP (1997) Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques.* **22**: 130-138.
- Woo S, Fogliano V, Scala F & Lorito M (2002) Synergism between fungal enzymes and bacterial antibiotics may enhance biocontrol. *Anton Leeuw Int J G.* **81**: 353-356.

- Woods DR & Bevan EA (1968) Studies on the nature of the killer factor produced by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Microbiol.* **51**:115-126.
- Wu C, Leberer E, Thomas DY & Whiteway M (1999) Functional characterization of the interaction of Ste50p with Ste11p MAPKKK in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell.* **10**: 2425-2440.
- Wu ZW, Robert V & Bai FY (2006) Genetic diversity of the *Pichia membranifaciens* strains revealed from rRNA gene sequencing and electrophoretic karyotyping, and the proposal of *Candida californica* comb. nov. *FEMS Yeast Res.* **6**: 305-311.
- Xia MQ, Hale G, Lively MR, Ferguson MA, Campbell D, Packman L & Waldmann H (1993) Structure of the CAMPATH-1 antigen, a glycosylphosphatidylinositol anchored glycoprotein which is an exceptionally good target for complement lysis. *Biochem J.* **293**: 633-640.
- Xu YY, Ambudkar I, Yamagishi H, Swaim W, Walsh TJ & O'Connell BC (1999) Histatin 3-mediated killing of *Candida albicans*: effect of extracellular salt concentration on binding and internalization. *Antimicrob Agents Chemother.* **43**: 2256-2262.
- Yale J & Bohnert HJ (2001) Transcript expression in *Saccharomyces cerevisiae* at high salinity. *J Biol Chem.* **276**: 15996-16007.
- Yamamoto A, Mizukami Y & Sakurai H (2005) Identification of a novel class of target genes and a novel type of binding sequence of heat shock transcription factor in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* **280**: 11911-11919.
- Yamamoto A, Ueda J, Yamamoto N, Hashikawa N & Sakurai H (2007) Role of heat shock transcription factor in *Saccharomyces cerevisiae* oxidative stress response. *Eukaryot Cell.* **6**: 1373-1379.
- Yan BC, Westfall BA & Orleans P (2001) Ynl038wp (Gpi15p) is the *Saccharomyces cerevisiae* homologue of human Pig-Hp and participates in the first step in glycosylphosphatidylinositol assembly. *Yeast.* **18**: 1383-1389.
- Yokoyama H, Mizunuma M, Okamoto M, Yamamoto J, Hirata D & Miyakawa T (2006) Involvement of calcineurin-dependent degradation of Yap1p in Ca(2+)-induced G(2) cell-cycle regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO Rep.* **7**: 519-524.
- Yoshimoto H, Saltsman K, Gasch AP, Li HX, Ogawa N, Botstein D, Brown PO & Cyert MS (2002) Genome-wide analysis of gene expression regulated by the calcineurin/Crz1p signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* **277**: 31079-31088.
- Young TW (1981) The genetic manipulation of killer character into brewing yeast. *J Inst Brew.* **87**: 292-295.
- Young TW (1987) Killer Yeasts. In: Rose AH & Harrison JS (eds.) *The Yeasts* (2<sup>nd</sup> edition). Academic Press, London, pp 131-164.
- Young BP, Craven RA, Reid PJ, Willer M & Stirling CJ (2001) Sec63p and Kar2p are required for the translocation of SRP-dependent precursors into the yeast endoplasmic reticulum in vivo. *EMBO J.* **20**: 262-271.

- Young TW & Yagiu M (1978) A comparison of the killer charcter in different yeast and its classification. *Anton Leeuw Int J G.* **44**: 59-77.
- Yu X, Li Z, Xia X, Fang H, Zhou C & Chen H (2007) Expression and purification of ancrod, an anticoagulant drug, in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif.* **55**: 257-261.
- Yun JJ, Heisler LE, Hwang, Wilkins O, Lau SK, Hyrcza M, Jayabalasingham B, Jin J, McLaurin J, Tsao MS & Der SD (2006) Genomic DNA functions as a universal external standard in quantitative realtime PCR. *Nucleic Acids Res.* **34**: e85.
- Zähringer H, Burgert M, Holzer H & Nkawa S (1997) Neutral trehalase Nth1p of *Saccharomyces cerevisiae* encoded by the NTH1 gene is a multiple stress responsive protein. *FEBS Lett.* **412**: 615-620.
- Zhang M, Bennett D & Erdman SE (2002) Maintenance of mating cell integrity requires the adhesin Fig2p. *Eukaryot Cell.* **1**: 811-822.
- Zhang F, Schmidt WG, Hou Y, Williams AF & Jacobson K (1992) Spontaneous incorporation of the glycosyl-phosphatidylinositol-linked protein Thy-1 into cell membranes. *Proc Natl Acad Sci USA.* **89**: 5231–5235.
- Zhang L, Zhang Y, Zhou YM, An S, Zhou YX & Cheng J (2002) Expression profiling of the response of *Saccharomyces cerevisiae* to 5-fluorocytosine using a DNA microarray. *J Antimicrob Chemother.* **49**: 905-915.
- Zeng G-F, Pypaert M & Slayman CL (2004) Epitope tagging of the yeast K1-carrier, TRK2, demonstrates folding which is consistent with a channel-like structure. *J Biol Chem.* **279**: 3003-3013.
- Zhao H & Eide D (1996) The yeast ZRT1 gene encodes the zinc transporter protein of a high-affinity uptake system induced by zinc limitation. *Proc Natl Acad Sci USA.* **93**: 2454-2458.
- Zhou XL, Vaillant B, Loukin SH, Kung C & Saimi Y (1995) YKC1 encodes the depolarization-activated K<sup>+</sup> channel in the plasma membrane of yeast. *FEBS Lett.* **373**: 170-176.
- Zhu H & Bussey H (1991) Mutational analysis of the functional domains of yeast K1 killer toxin. *Mol Cell Biol.* **11**: 175-181.
- Zhu H, Bussey H, Thomas DY, Gagnon J & Bell AW (1987) Determination of the carboxyl termini of the a and b subunits of yeast K1 killer toxin. *J Biol Chem.* **262**: 10728-10732.
- Zhu Y, Kane J, Zhang X, Zhang M & Tipper DJ (1993) Role of the g component in expression of the yeast k1 killer phenotype. *Yeast.* **9**: 251-266.
- Zhu YS, Zhang XY, Cartwright CP & Tipper D (1992) Kex2-dependent processing of yeast k1 killer preprotoxin includes cleavage at ProArg-44. *Mol Microbiol.* **6**: 511-520.
- Zorg J, Kilian S & Radler F (1988) Killer toxin producing strains of the yeasts *Hanseniaspora uvarum* and *Pichia kluyveri*. *Arch Microbiol.* **149**: 261-267.





## ANEXO 1

### SOLUCIONES Y REACTIVOS PREPARADOS EN EL DESARROLLO EXPERIMENTAL

Los reactivos y soluciones que a continuación se detallan se agrupan según la técnica en la que son empleados, ordenándose cada una de estas técnicas en función del momento de su aparición en el capítulo de material y métodos.

#### Electroforesis de ARN en geles de agarosa

- Tampón de carga:

Azul bromofenol 0,25% (BioRad) .....	0,3 ml
Xileno cianol 0,25% (BioRad) .....	0,3 ml
Tris-HCl 1,0 M (pH 8,0) .....	0,1 ml
EDTA 0,5 M (pH 8,0) .....	1,5 ml
Glicerol (Merck).....	5,0 ml
Agua destilada .....	2,8 ml

- Tampón TAE 1X:

Tris-Base (Sigma) .....	48,4 g
Ácido acético glacial (Merck) .....	10,9 g
EDTA (Sigma) .....	2,9 g
Agua destilada .....	1.000 ml

#### Northern Blot:

- ADN de espermatozoos de salmón desnaturalizado:

Stock: 10 mg/ml en agua autoclavada.

Conservación: -20 °C.

Desnaturalización: Calentar a 100 °C durante 5 minutos y a continuación enfriar en hielo un mínimo de 3 minutos. Desnaturalizar siempre tras descongelar.

- Acetato sódico 3M - DEPC:

Acetato sódico (Merck) .....	246,1 g
Agua destilada .....	1.000 ml

Disolver bien y posteriormente añadir en esterilidad:

DEPC (Dietil pirocarbonato) (Merck) .....	1 ml
---	------

Disolver a temperatura ambiente y en agitación (24h). Autoclavar y guardar a temperatura ambiente.

- Agua DEPC:

DEPC .....	0,2 ml
Agua milli-Q .....	100,0 ml

Agitar 24 horas hasta disolver y después autoclavar.

- DENHARDT 50X:

Ficoll 400 (Sigma) .....	10 g
Polivinilpirrolidona (Sigma) .....	10 g
BSA (Sigma) .....	10 g
Agua DEPC estéril .....	1.000 ml

Filtrar (0,45 µm) y guardar congelado (-20 °C)

- EDTA 1,0 M pH 8,0 (Solución stock):

EDTA .....	372,2 g
Agua destilada .....	800 ml

Disolver ajustando el pH a 8,0 con NaOH. Posteriormente, añadir:

Agua destilada .....	Enrasar hasta 1.000 ml
----------------------	------------------------

Autoclavar y conservar a temperatura ambiente. Diluir convenientemente en agua destilada hasta lograr la molaridad deseada en cada caso.

- MOPS 10X:

MOPS (Merck) .....	41,8 g
Agua DEPC .....	800 ml

Ajustar a pH 7.0 con una solución NaOH 0,1 M o HCl 0,1 M. A continuación, añadir:

Acetato sódico 3 M - DEPC .....	16,6 ml
EDTA 0,5 M pH 8,0 .....	20,0 ml
Agua DEPC .....	1.000 ml

Filtrar (0,22 µm) para su esterilización y conservar a temperatura ambiente protegido de la luz.

Preparar las diluciones necesarias de este tampón añadiendo en cada caso el volumen de agua DEPC requerido.

- Tampón de electroforesis:

MOPS 10X .....	200 ml
Formaldehído 37% .....	60 ml
Agua destilada estéril .....	Enrasar hasta 2.000 ml

- Sephadex G-50:

Sephadex G-50 (Pharmacia) .....	10 g
Agua milli-Q autoclavada .....	160 ml

Lavar varias veces con agua milli-Q autoclavada para eliminar el dextrano soluble. Equilibrar con tampón TE (pH 7,6) y autoclavar para su esterilización. Conservar a temperatura ambiente.

- SET 0.2X:

SDS 10% .....	2 ml
EDTA 0,5 M pH 8,0.....	2 ml
Tris-HCl 0,1 M (pH 7,5-8,0) .....	1 ml
Agua destilada estéril .....	Enrasar hasta 100 ml

- Solución de desnaturalización:

MOPS 10X.....	10,0 µl
Formaldehído 37%.....	17,5 µl
Formamida.....	50,0 µl

- Solución de hibridación:

SDS.....	7 g
Tampón fosfato sódico 1,0 M (pH 7,5) .....	25 ml (concentración final 0,25 M)
EDTA 100 mM pH 8,0.....	1 ml (1,0 mM)
BSA.....	1 g
Agua DEPC estéril.....	Enrasar hasta 100 ml

Conservar en nevera (4-8 °C) protegido de la luz.

- Solución de lavado:

SDS.....	0,1 g
Tampón fosfato sódico 1,0 M (pH 7,5) .....	2 ml (concentración final 20 mM)
EDTA 100 mM pH 8,0.....	1 ml (1,0 mM)
Agua DEPC estéril.....	Enrasar hasta 100 ml

- Solución de prehibridación:

Denhardt 50X.....	50 ml
SSC 20X .....	75 ml
Formamida.....	250 ml
EDTA 0,5 M pH 8,0.....	1 ml
SDS 10% .....	10 ml
ADN esperma salmón desnaturalizado .....	5 ml
Agua DEPC estéril.....	Enrasar hasta 500 ml

Conservar en nevera (4-8 °C) protegido de la luz.

- SSC 20X:

NaCl .....	175,3 g
Citrato sódico · 2 H <sub>2</sub> O .....	88,2 g
Agua destilada estéril .....	800 ml

Ajustar el pH a 7,0 con HCl 1 M. Posteriormente, añadir:

Agua destilada estéril .....	Enrasar hasta 1.000 ml
------------------------------	------------------------

Filtrar y alicuotar.

Preparar las diluciones necesarias de este tampón añadiendo en cada caso el volumen de agua destilada estéril requerido.

- STE 1X:

NaCl .....	0,584 g
Tris-HCl 0,1 M (pH 7,5-8,0) .....	10 ml
EDTA 1,0 M pH 8,0.....	1 ml (concentración final 10 mM)
Agua destilada estéril .....	Enrasar hasta 100 ml

- TE:

Tris-HCl 1,0 M (pH 7,4).....	1 ml (concentración final 10 mM)
EDTA 1,0 M (pH 8,0) .....	1 ml (10 mM)
Agua destilada estéril .....	100 ml

- Tris HCl 10 mM pH 7,4:

Tris-base .....	0,24 g
Agua milli-Q .....	150 ml

Ajustar pH a 7,4 con HCl concentrado al 37%.

Enrasar hasta 200 ml con Agua milli-Q.

## PAGE-SDS

- ◆ Reactivos para geles de acrilamida:

- Tris-HCl 1,5 M pH 8,8:

Tris-base.....	36,34 g
Agua milli-Q .....	150 ml

Ajustar pH a 8,8 con HCl concentrado al 37%.

Enrasar hasta 200 ml con Agua milli-Q.

- Tris-HCl 0,5 M pH 6,8:

Tris-base.....	12,12 g
Agua milli-Q .....	150 ml

Ajustar pH a 6,8 con HCl concentrado al 37%.

Enrasar hasta 200 ml con Agua milli-Q.

- Acrilamida/Bisacrilamida 30%:

Acrilamida .....	30 g
Bisacrilamida .....	0,8 g
Agua milli-Q .....	Enrasar hasta 100 ml

Filtrar (0,22 µl) para su esterilización.

- SDS 10%:

SDS (Sigma).....	1 g
Agua milli-Q .....	Llevar hasta 80 ml aprox.

Agitar con cuidado para no formar burbujas. No ajustar pH.

Agua milli-Q .....	Enrasar hasta 100 ml.
--------------------	-----------------------

- APS 10 %:

APS (Persulfato amónico) .....	90 mg
Agua milli-Q .....	900 µl

♦ Preparación de Geles de Acrilamida (12%):

- Gel separador:

Agua milli-Q .....	5,6 ml
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8 .....	4,0 ml
Acrilamida/Bisacrilamida 30% .....	6,4 ml
SDS 10% .....	150,0 µl
APS 10% .....	150,0 µl
TEMED (BioRad).....	9,0 µl

- Gel concentrador:

Agua milli-Q .....	6,4 ml
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 .....	2,5 ml
Acrilamida/Bisacrilamida 30% .....	1,0 ml
SDS 10% .....	120,0 µl
APS 10% .....	150,0 µl
TEMED (BioRad).....	9,0 µl

♦ Reactivos para electroforesis:

- Tampón de carga 4X:

Glicerol.....	8,0 ml
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8.....	8,0 ml
Azul de bromofenol.....	10,5 ml
SDS .....	2,3 g
Agua milli-Q .....	Enrasar hasta 20 ml

- Solución stock 5X:

Glicina .....	72 g
Tris-base.....	15 g
Agua milli-Q .....	Enrasar hasta 1.000 ml

- Tampón de electroforesis:

Solución stock 5X .....	200 ml
SDS 10 % .....	20 ml
Agua milli-Q .....	Enrasar hasta 1.000 ml

- Solución Stock 5X (Geles tris-tricina):

Tricina .....	89,6 g
Tris-base.....	60,5 g
SDS .....	5,0 g
Agua milli-Q .....	Enrasar hasta 500 ml

- Tampón de electroforesis (Geles tris-tricina):

Solución Stock 5X .....	200 ml
SDS 10 % .....	20 ml
Agua milli-Q .....	Enrasar hasta 1.000 ml

♦ Tinción/decoloración del gel:

- Solución de azul *Coomassie* R-250:

Azul <i>Coomassie</i> (BioRad) .....	1,25 g
Metanol.....	227 ml
Ácido acético .....	46 ml
Agua milli-Q autoclavada.....	227 ml

- Solución decolorante (*Coomassie*):

Metanol.....	50 ml
Ácido acético .....	70 ml
Agua milli-Q autoclavada.....	Enrasar hasta 1.000 ml

**Western Blot:**

- Tampón de transferencia (Towbin):

Tris-base .....	4,8 g
Glicina .....	22,5 g
Metanol .....	400 ml
Agua milli-Q .....	Enrasar hasta 2.000 ml

Desgasificar y después sonicar 15 minutos.

- Rojo *Ponceau*:

Rojo <i>Ponceau</i> (Merck) .....	1 g
Ácido acético.....	2 ml
Agua milli-Q .....	Enrasar hasta 200 ml

- Solución *Coomassie*:

Azul <i>Coomassie</i> (BioRad).....	0,05 g
Metanol .....	25 ml

Añadir agua milli-Q hasta aproximadamente 60 ml y después:

Ácido acético.....	7 ml
Agua milli-Q autoclavada.....	Enrasar hasta 100 ml

- TBS 10X:

NaCl .....	80,0 g
Tris-base .....	24,2 g

Añadir agua milli-Q hasta aproximadamente 800 ml

Ajustar a pH 7,6 con HCl y enrasar con agua milli-Q hasta 1.000 ml

- TBS-TWEEN 0,1%:

TBS 10X.....	100 ml
Tween 20 (Sigma).....	5 ml
Agua milli-Q .....	Enrasar hasta 1.000 ml

- TBS-TWEEN 0,1%-LECHE DESNATADA 5%:

Leche en polvo.....	5 g
TBS-TWEEN 0,1%.....	Enrasar hasta 100 ml

## Preparación de protoplastos

- Medio de Pretratamiento:

Ditiotreitol (Merck).....	7,710 g (concentración final 50 mM)
EDTA .....	0,185 g (5,0 mM)
Pronasa (Sigma-Aldrich).....	0,5 mg/ml
Agua destilada estéril .....	Enrasar hasta 100 ml

## Aislamiento de proteínas de membrana plasmática

- MOPS/Tris HCl 1,0 M pH 7,2:

MOPS .....	41,80 g
Tris-base .....	24,24 g
Agua milli-Q .....	150 ml

Ajustar pH a 7,2 con HCl concentrado al 37%.

Enrasar hasta 200 ml con Agua milli-Q.

- Tampón para fragmentos pequeños de membrana:

MOPS/Tris HCl 1,0 M pH 7,2.....	100 µl (concentración final 10 mM)
EDTA 1,0 M pH 8,0.....	10 µl (1,0 mM)
Glicerol.....	2,5 ml
Agua milli-Q .....	Enrasar hasta 10 ml

Posteriormente, añadir la misma cantidad de inhibidores de proteasas que en el caso del tampón de aislamiento.

Conservar en nevera (4-8 °C).

- Tampón de aislamiento:

Sorbitol .....	2,55 g (concentración final 1,4 M)
MOPS/Tris HCl 1,0 M pH 7,2.....	100 µl (10 mM)
EDTA .....	10 µl (1,0 mM)
Agua milli-Q .....	Enrasar hasta 10 ml

Posteriormente, añadir:

PMSF .....	17,4 mg (concentración final 1,0 mM)
Leupeptina .....	100 µg
Pepstatina .....	100 µg
Quimotripsina.....	100 µg

Conservar en nevera (4-8 °C).

### Aislamiento de proteínas de membrana plasmática

- Solubilización de proteínas de pared celular:

SDS 10% .....	100 µl (Concentración final 0,1 %)
EDTA 1,0 M pH 8,0.....	100 µl (Concentración final 10 mM)
β-mercaptoetanol (BioRad).....	10 µl (0,01 %)
Agua milli-Q .....	Enrasar hasta 10 ml

### MALDI-TOF-MS del receptor secundario

- Solución de preparación de la matriz:

Ácido α-hidroxi-cinámico (Bruker-Daltonics) .....	1 mg
Acetonitrilo 70% / TFA 30%.....	1 ml

### Microscopía de fluorescencia

- Tampón PBS:

NaCl .....	80,0 g
KCl .....	2,0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	2,0 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	6,1 g
Agua destilada .....	Enrasar hasta 1.000 ml

Ajustar el pH del tampón a 7,4 empleando NaOH o HCl.

### Obtención de células competentes

- CaCl<sub>2</sub> 1M (Stock):

CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O .....	14,7 g
Agua destilada .....	Enrasar hasta 100,0 ml

Esterilizar en autoclave y conservar en nevera (4-8 °C).



- Solución de Carbenicilina (Stock):

Carbenicilina (Sigma-Aldrich) .....	300 mg
EtOH 50% .....	6 ml

Filtrar (0,22  $\mu$ m) para su esterilización y alicuotar en tubos *Eppendorf* (0,5 ml/tubo).

Conservar a -20 °C.

- Solución TELT:

LiCl (Merck).....	5,3 g
Tris 1,0 M pH 8,0 .....	2,6 ml
EDTA 0,5 M pH 8,0.....	6,3 ml
Triton X-100 al 20% (Panreac) .....	10,0 ml
Agua destilada .....	Enrasar hasta 50,0 ml

## ANEXO 2

**Tabla 12.** Secuencia genética de los oligonucleótidos empleados para la amplificación por RT-PCR de los genes regulados positivamente (tasas de expresión mayores a +3,0) tras la exposición a la toxina PMKT.

Gen	ORF	Oligonucleótido 1 (5' → 3')	Oligonucleótido 2 (3' → 5')
<i>TFS1</i>	YLR178C	TCGCACAAGCAAGCATTGAC	CACGGCATTCTGGAGGATG
<i>GSP2</i>	YOR185C	TCGATGTCTGGGATACCGC	ATTTGGCGGGTTAAGGGATG
<i>NAM8</i>	YHR086W	GCAAATGTTGCGGGTTTGTG	GGCTATCGGCTGAGGCTG
<i>GIP2</i>	YER054C	TTCTCCGCAGGGAATGATG	TGAGAGCGGCTGGTCAAAA
<i>SDS22</i>	YKL193C	TCCTTTGAGAGCTTGGGTGAA	CCCTATCACGCTTGGAGACC
<i>YAP1</i>	YML007W	TGTCTACCGCCAAGAGGTGCG	TCTCCGGGTTTATTAGCGG
<i>CUP2</i>	YGL166W	TTGAAGCCACCTCTGCAAAA	AGGCCGACAGCATTGACAAT
<i>XBP1</i>	YIL101C	CATCACCCACCAAGCAACAA	GTCAACAGCATCGCGTGAAA
<i>REG1</i>	YDR028C	GTCAGCTGGTTAATCGAAGCG	GCAGTGTGACACCAGCAAACA
<i>PAP1</i>	YKR002W	GAATTGGCCACAACCTGTTATCT	TTGAGGATGGCCCCGTTACA
<i>KSP1</i>	YHR082C	ATTGCTCTGGCGGCGGTGACCTA	AAAGCCGATGCTGTGCCTA
<i>KKQ8</i>	YKL168C	CACCTTATCGTGGCTCGA	GAAAAGTAAAGACCGGGCGC
<i>PTK2</i>	YJR059W	CACCTTATCGTGGCTCGAACA	GAAAAGTAAAGACCGGGCGC
<i>AKL1</i>	YBR059C	TTCCAAGCAAAGGCACAGATT	CGGCATTCTGAAGGATAAGGA
<i>SCH9</i>	YHR205W	CACCACGGAATACCTGGCA	TGGACGAAACCGGCTACAC
<i>STE20</i>	YHL007C	AACACCGCCTGCAAACTCAT	TCCTCCGTCGACAAGTGATTC
<i>PSK1</i>	YAL017W	ATGGATGATGTGAGGAATGGG	ATCCCGATGACGACCTTTTG
<i>PBS2</i>	YJL128C	TCTTCGACGTCTCTCGACTA	ACGCTGACCTTCATGCTCGT
<i>MED2</i>	YDL005C	TTGAGAACGCAAATGCTGCT	CCGCATTTTCTCCCTTAACCA
<i>ITC1</i>	YGL133W	GTTGGGATTGGATCGATACGG	TTTTTGCTGGATCACAATGG
<i>TIS11</i>	YLR136C	CACGGACTCGGCGAATTAAT	TCGTGCAAGAATTTTCAGGACG
<i>UGA3</i>	YDL170W	TACAGCACCAAGTTGATCAGCAA	GCATGCTCCTGACAGTGCTC
<i>SRB2</i>	YHR041C	TATCCTGTCCGTGCGAGACC	GACTTTTCGACGTACCGGTG
<i>SRB4</i>	YER022W	ATGCCGTTGGAGCAATTGAT	TAAGACAGCGTGGTCCAGGC
<i>GAL11</i>	YOL051W	TTTCTCCAGAGGAGCAACGC	AGAAGCCATCGAAACCTGCA
<i>HAL9</i>	YOL089C	GCAGGAAGGCAAATACAAGGAA	GCCCCAACCCAGCGAGAAA
<i>PRP18</i>	YGR006W	TACGAAGGAACCAGCTTGCC	TATTTCCCTTGCGACCGTTC
<i>NSR1</i>	YGR150C	TTTGAATTATTCGCTAAACACGG	TTTCCGTCCGTATCCCAACA
<i>CDC40</i>	YDR364C	GACGGAAAACTCGCAAAGGA	GGGGCAGTTGGTCAAGTAGTG
<i>CBC2</i>	YPL178W	GTACCTGCTGCGCAAGGC	AACGGGCTACAAGAACTGCG
<i>TPS1</i>	YBR126C	CAGGTGAGGAAGGACTTGCTG	ATGCCGTACCCATCTTCTCTG
<i>TSL1</i>	YML100W	TGTCTGGCTCAGCGTGAGAA	GCTTGACCGGTGCAGACTTT
<i>NTH1</i>	YDR001C	ACGTCATACGAATCCGCAACT	CATTATGGGCTGGACTTGCC
<i>GPP1</i>	YIL053W	GCAAGGTAAGCCTCACCCAG	AAAGGGTAGAAACGGTTTGGG
<i>GPP2</i>	YER062C	GTGCAACGCTTTGAACGCT	AAATGGGCTGTGGCAACTTC
<i>GPD1</i>	YDL022W	CGTGAAATACTTGCCCTGGCA	CCGACAATTTGGTTGCTAATCC
<i>DAK1</i>	YML070W	CATTTTGGTATGTCCGCTGA	CCTTGGGTATTAAGTCCGC
<i>GLC3</i>	YEL011W	GATGCCGCTATGTACACCGA	ATTGAAGGAACCATCCATCGTT
<i>MBR1</i>	YKL093W	AATCGGCCCCGTGAAATATC	CGAACGATACAGGGGACACC
<i>FPS1</i>	YLL043W	CGCCGAGTGCAAGCAGTAAT	GCCTAGAGGGCAGACCACAG
<i>HEX3</i>	YDL013W	GGAGCAGGAATTCTCAACGG	CAAGCTCTGAGCGCCCTG

Tabla 12. Continuación.

Gen	ORF	Oligonucleótido 1 (5' → 3')	Oligonucleótido 2 (3' → 5')
<i>PGM2</i>	YMR105C	GGTTACGGCCCATCTTTCGT	ACTCCGTCGCAATTATTGCC
<i>INO1</i>	YJL153C	GCTGGCTGAGCATGAGGGTA	GGAGACGATCTCAAGTCGGG
<i>GLK1</i>	YCL040W	AGGAAGGCCACACATTGGC	TCTTCCTATGATTCCGGCGT
<i>TKL2</i>	YBR117C	AGGTGGAAAGCGCACAATCT	TGCACCACTAGGATTGGCAC
<i>BDH2</i>	YAL061W	ATTGCTGATGGTGGAGACGG	CATTGATTGCTCCGGGTTG
<i>HXT1</i>	YHR094C	AAATCAGCTTCCTGGGTTCCA	GAGGCGCTGACTACAACGCT
<i>HXT11</i>	YOL156W	GCGTGTTCTCATGGGAGTGA	CTGCAGCAATTAACCGGTGA
<i>HXT5</i>	YHR096C	TTTCCGATGTCAGAACCGGT	CTATTTTCAACATCGGCTGCG
<i>HXT14</i>	YNL318C	AGAAGGCCAAGCAGCAAAGAT	GCGAGTCTGCATATTCCCGT
<i>STL1</i>	YDR536W	GTTCTCCAGAGGCAGGTCCC	AGGGCTTTGATTGCAGCTTC
<i>GLO1</i>	YML004C	AGGATCCAGCAAGGACCGTT	CCGAACACTTCGGTATAGAAGC
<i>PSK1</i>	YAL017W	ATGGATGATGTGAGGAATGGG	ATCCCGATGACGACCTTTTG
<i>DLD3</i>	YEL071W	TCTTCCATTGGATCTGCCT	ACTGTCAAGTGGGCGGTGTAG
<i>ALD5</i>	YER073W	ACCCGCTGAAACAACACCTT	TTCGCTTCCAGTTGTGTCA
<i>ALD4</i>	YOR374W	CCTGCTTTGGTCACCGGTAA	TGAAGACTGACGAATCCACC
<i>ALD2</i>	YMR170C	CCAAGGTCGGTGGATTTGTG	CGGCCAATCGAACCTTAAAG
<i>ALD3</i>	YER073W	GTGAACCCAGCTACTGGCGA	TCCTTCCAAGCAGCTAACGAA
<i>STF2</i>	YGR008C	CGTGAAGGAAAGGCTGATCC	TTCGCACACTGGTAACTACGGT
<i>CYB2</i>	YML054C	CCAAAATCCAAGTCGTTCGAA	AAGAAAACGCACACAGTCATGG
<i>CYC7</i>	YEL039C	AGAACGTCAAATGGGATGAGGA	CCGAGTACTTGACGAACCCAA
<i>GRE3</i>	YHR104W	ATTCTATACGGGCGCAGATGA	GGTCACATCACCGAAGCACA
<i>GCN4</i>	YEL009C	AAACGGCAACTGCACCTGAT	TTTGCCAATTCGGGAGCTAG
<i>AVT6</i>	YER119C	TCGGCAGAATAGCGATTGTG	GCTGGCGTTCCCACTACAGT
<i>ARO9</i>	YHR137W	CGGGTCCAACGATTCAATGT	TTGAAACAATTTGCTACGAATC
<i>PHO11</i>	YAR071W	CTCCTACGGCCAAGACTTGG	CAAACGGGACCAGGCTATGA
<i>PHO5</i>	YBR093C	TAGCCGCTTCTTTGGCCA	TCCCTTAGGCAAAGTAGCCG
<i>PHO86</i>	YJL117W	GAAGGTCGTCTCAGCGGT	CGCAATTGGTGCATCTTTCTT
<i>PHO84</i>	YML123C	TGCCACTACCAATGGAGAGG	GGGTGCTGTCTTTGCTAACCA
<i>PSR1</i>	YLL010C	TGCTGCTCTTCCGAGACGA	TCCAATTCTGCTTATCGCCAA
<i>SDP1</i>	YIL113W	TCTCTTCCTATGCTGGCCACA	CTACGGACAAAGAAAGCCCG
<i>PHO89</i>	YBR296C	TGCAGCCACTATGTCTTTTGCT	CTAATGACGTTGCCAACGCTAC
<i>PHO87</i>	YCR037C	AAACCTTATGGAATCGGCTGG	TTGTGTGCTGCTCTGCCTACA
<i>IST1</i>	YNL265C	CAAATAAAGAACAGAAGGCGCA	GTGGAGACGCTAATTCATGACG
<i>NHA1</i>	YLR138W	CGTGCATTACCGCAACAGAT	CAGTCGGTCTCTCCGGTA
<i>TOK1</i>	YJL093C	TCTGAAAGGGAAGCGTTTCA	GTATCCGACAAACGGCCTCA
<i>ENA1</i>	YDR040C	TTGCTTTTCTGGATTGCCGT	TCATCGTCATGGCCTCTCAA
<i>TRK2</i>	YKR050W	CATTACATTGCTGTCCACGCC	CATGGGTTTTTGGCCTTTGT
<i>GRE1</i>	YPL223C	TCAAGGTCAGTTGGACGACG	CTTCTTGACTTCGGGCCA
<i>GIT1</i>	YCR098C	GAGGCGATCTGGAGGACTGTT	GGTGCTTCTGGCCATTGAGT
<i>ZRT1</i>	YGL255W	ATGGTGCGATTGGTGGTACC	GACAAACCGGTAAGTGGGGTC
<i>SIT1</i>	YEL065W	TCCGTTACACTTTCCAGGCG	GTCGTACTCCCAGCACTCGC
<i>PDR12</i>	YPL058C	TTGTTTTTGGATGAGCCTACCTC	GGACTCTCAGTCTGCTTGGTCA
<i>PDR5</i>	YOR153W	TTTCTAGTGCCGCTGGGT	TCACCTAAGTGCGGCAGACC
<i>CTR3</i>	YLR411W	TTGCTGGTCTTGCATCGG	TTGTGGTGGTAGCTCAATGGC
<i>HSP12</i>	YFL014W	CGAAAAAGGCAAGGATAACGC	AGGTGAATCTTTGGCAGACCA

**Tabla 12.** Continuación.

Gen	ORF	Oligonucleótido 1 (5' → 3')	Oligonucleótido 2 (3' → 5')
<i>HSP104</i>	YLL026W	GAAACAAGGCCCTTGATGA	ATGATACTGCTACCGCCGCT
<i>HSP82</i>	YPL240C	AGAGCAACGACGACGAACAA	ATCCAACGCTGGTGGTTCTT
<i>HSP26</i>	YBR072W	AGAGGCTACGCACCAAGACG	ACACACCCGCAAAGGATTCT
<i>DDR2</i>	YOL052C-2	CTGTCTTCGGCCTCGCTACT	TCAAAACGCATCCAACACCA
<i>SSA2</i>	YLL024C	GCTGCTATGAACCCAGCTAACAC	ACGCTAAGCGTTTGATCGGT
<i>SSB2</i>	YNL209W	TGGTAGAAGATTTCGACGACGAG	AAAGGACATGAAGACCTGGCC
<i>SSA1</i>	YAL005C	TGCTATGAATCCTTCGAATACCG	CGCTAAGCGTTTGATCGGTAG
<i>FAP7<sup>a</sup></i>	YDL166C	TCGATGCCGAGATTATGGGT	GGATGCCGTGGAATCATACG
<i>WSC4</i>	YHL028W	AGACATCGGTGGGAGACTGC	TCCCGTTTATGGCTACGAAG
<i>SCH9</i>	YHR205W	CACCACGGAATACCTGGCAC	TGGACGAAACCGGCTACAC
<i>CTT1</i>	YGR088W	CCGTTGGTGGTGAAAGTGGT	CTGCAAGAGACCCAAGAGGTG
<i>STI1</i>	YOR027C	CTCGACGAAGCTGAAAGCAAC	CCTTGAGTTGGATGCCAGT
<i>SDP1</i>	YIL113W	TCTCTTCCTATGCTGGCCACA	CTACGGACAAAGAAAGCCCG
<i>GRE2</i>	YOL151W	ACGGAGGCCCTTTGGTAACAA	TCCATGGAAGTTGTCCCAGAC
<i>MPH1</i>	YIR002C	AGCGGCGAATGATAAACTTGA	GACGAACGGGGAGCTCTGA
<i>CSF1</i>	YLR087C	TCAACCAACTATGCCGATGC	GGAAATACCCTGGTGCTTTACATTA
<i>SPS100</i>	YHR139C	ATATTGAGTAGTTCGGACGCGG	GCACTTTGGTTGCCGGTAGA
<i>ECM33</i>	YBR078W	AGTCTAAGGGTGCTGCTCCAGA	CAGCCACTTCATTTCATGGGTG
<i>HBT1</i>	YDL223C	GGTGGTAAGCCCGGTTCTTA	TCAGATTCTGCTCAACGCAAA
<i>MSC1</i>	YML128C	AAAAACGGCGTGATGTTGA	CTTCCAAGGACTCGCTGGTG
<i>PNC1</i>	YGL037C	ACTCTCCAAGGCCAGGCG	AGAGGGTATTTTGTGGCCCG
	YKL091C	CCGATATTGGTCCCTGGAGA	ACATCGGACCAGAAGGTGAAA
	YFL015C	AGTCCTTGTCCTCAAGAGCCA	AACACGTCGTATTGCTACCG
	YFR020W	TGTCAACCGTGTTGGATTGT	TGATGGTTGGAACCTCGCGT
<i>IKI1</i>	YHR187W	AACAAACAGAAGCTGGCCAAA	CATTGCCTTTTCTGGAGGCA
	YFR026C	AGGAGTTTGAACGATCCGCA	GGCCGGAAGGAAGGAAGAC

**Tabla 13.** Secuencia genética de los oligonucleótidos empleados para la amplificación por RT-PCR de los genes regulados negativamente (tasas de expresión menores a -2,0) tras la exposición a la toxina PMKT.

Gen	ORF	Oligonucleótido 1 (5' → 3')	Oligonucleótido 2 (3' → 5')
<i>RGT1</i>	YKL038W	GCAGCAACCGTACAACCCAT	TTGGCCAGTTCGCTGCTAA
<i>RDI1</i>	YDL135C	TCACAGGGTTGCGATATGTCC	AAAGCGGGTATTGCCGTTG
<i>YVH1</i>	YIR026C	CAATGGCTATGCACGCTGTC	ACCGAGTGTGAGCCAAACG
<i>MET18</i>	YIL128W	AAACTGCCAATTCCCCCA	GCTTTTCGGAACGGTTCAAC
<i>HAP4</i>	YKL109W	ATGCAACTGCCACCAATGAA	GCAGTTTCATCGACGACCTTG
<i>MTF1</i>	YMR228W	AAAGGGAAAGCCAATTGCGT	TGGACCCAATTGACTTCGATTT
<i>PAB1</i>	YER165W	AAGAGGTGTTCCATTCAACGGT	ACAACAAATGAACCCAATGGG
<i>NOP1</i>	YDL014W	ATTGCCCCAGGCAAGAAAGT	GGTGCTGCTTCCGGTACTTCT
<i>UTP4</i>	YDR324C	TGACGAAAACATGGGTGCTCT	TATGAAGGTCGACAAGGCCAA
<i>RPF2</i>	YKR081C	GGAGATTGGGCCACGTCTAG	ATCGGCAGAATTCATACTCCAAG
<i>EFB1</i>	YAL003W	GGCTTTCCAATCTGCTTACCC	CAGATGGTTCAACCACATCGC
<i>ATF2</i>	YGR177C	TGGTTCAGGGCACTCTACGG	ATGGGAATCGTTCTGCAAGC

Tabla 13. Continuación.

Gen	ORF	Oligonucleótido 1 (5' → 3')	Oligonucleótido 2 (3' → 5')
<i>GPH1</i>	YPR160W	CGGCGATTATTACCTGGTCAG	GAATCCTATCTGGCCACCCA
<i>TAL1</i>	YLR345C	GCCAAGCAACCAACTTACGC	ATGTTGCCGTGGAATACGGT
<i>GND1</i>	YHR183W	AGATTGGGTGGGTTTACCGAT	AGTGACGTTTTTGCCAAATGG
<i>ACO1</i>	YLR304C	CTGCACGTTCTGCCATCAAG	TCGTGGTCTTGCGACAGTCT
<i>QCR9</i>	YGR183C	ACGAAACGCTGTTTTGTTGG	GCAGGTGCCTTTGTTTTCCA
<i>CYC1</i>	YJR048W	TGTCTACAATGCCACACCGTG	GCCACATAAGGTTGGTCCA
<i>YTA12</i>	YMR089C	TACAAGTGGCGCATCTGATGA	GTTACTAGCATGGCCACGGC
<i>MBA1</i>	YBR185C	TCTCGAGGCTAGGTCCCGT	AATGCAACACTGGACTGGCA
<i>CHA1</i>	YCL064C	GCTAGTTCTGGCGGTAATGCC	GCTGCAACAGCATGTCAAAGA
<i>FUR1</i>	YHR128W	AAAATACCATGCCGCCCTTCC	AATTGTTACTGGTGCCCTCGA
<i>MET6</i>	YER091C	CACCAAGAACGTTTCCGGTC	GCTGCCCTAGAAGCTAACGC
<i>ERG3</i>	YLR056W	GCTCTGCACAAGCCTCATCA	GTCTGCACACCTTTCGCATCT
<i>SAM1</i>	YLR180W	TGGACGCTTGTTAGCCGAG	CAAAGTTGCGTGTGAAACCG
<i>ERG25</i>	YGR060W	CGCCCATTACCAACCTCAAT	GAGAAATACTGGGCCGCATG
<i>OLE1</i>	YGL055W	TTGACGACCAATTTCAAAGG	AGCAGTGGCATTGTGACG
<i>FAA4</i>	YMR246W	TATTCGGTTGCAGTTGGCG	AGCATGAAACCGCTCCAAGA
<i>FRE1</i>	YLR214W	CGGTTCCACATATCGCTAAGC	AATCTGGTAGGTGTAGCCGCTG
<i>BTN2</i>	YGR142W	TTAGTCAGCCCCTACATTGCG	TGATTGCAGTTCTCCAGTGAGC
<i>PMP2</i>	YEL017C-A	TTGTAATCGCCATCATTCTACCA	ATCTACAGAAAATGGCAAGCTAGACA
<i>PHO88</i>	YBR106W	AAGCGCTTTGGAACACAACG	CACCTCTTCGGTAAGCCTGC
<i>CTR1</i>	YPR124W	ACGAGCTGTCTGGCTTCGGT	TGGTAGACATCCCGAACCCA
<i>PMA1</i>	YGL008C	TTATTGGTGTCCCAGTCGGTTT	CGTTACCACCACTATGGCCG
<i>TPO2</i>	YGR138C	GGGCAACAACCTCAACAGT	CAAAAACCAACTCTCGTGCAA
<i>HSP30</i>	YCR021C	TCATCACCATGCTACGGACG	GCGGCTCCTGAAACAAAAGA
<i>ECM10</i>	YEL030W	GCGGAGGCTTACTTAGCGAA	AATGCTGTTGTACCGTTTCT
<i>MRH1</i>	YDR033W	TTTCGGACCTAGTGATGCCG	GCTCCAAAAGCTCCAGTTGC
<i>YEN1</i>	YER041W	ATCAATGCTCGCCTTCAAGG	TTGCCTCCAACTTGACTGCT
<i>SOD2</i>	YHR008C	CAACACAAAGCTAGCAGGCG	GGATGGGCCTTCATTGTCAA
<i>NOP13</i>	YNL175C	TGAAAAGAGCAGAGTCACCGAA	ACCAGGTTATCCATGCCTCG
<i>YHB1</i>	YGR234W	ACCAAATGCCTTGGCCACTA	AGCGGCTAAGAACATTGACGA
<i>IMD4</i>	YML056C	AAAACATTGGCCACATACCA	CTTGGTTCCTCCACCGTCA
<i>ZEO1</i>	YOL109W	AACATTGCTGATGGTGTCGAAC	ACCGAAGCTGCCAACAAAGTT
	YLL044W	CTGGCCATTTGACGTATCTGG	CTTTGGTTGGACAGCTTGGC
	YEL059W	CGCTTTCACGATACCGCATT	TGCGGAAGTGTGGATGAGTG
	YBL077W	TGGCTTCCAAACCACACTTCTT	TTTTTGGATTCTGTTGACCAGCT